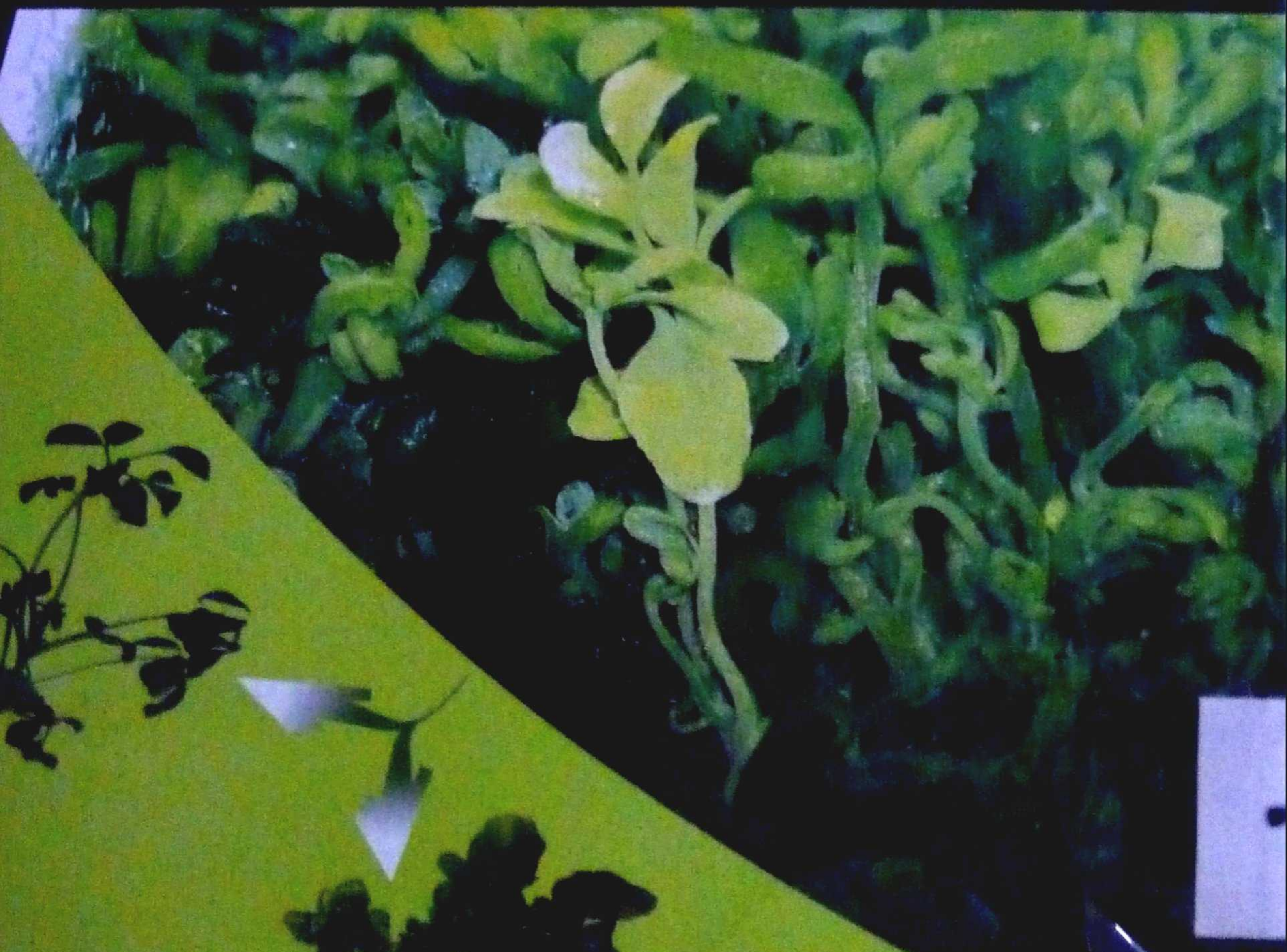
زراعة
الأنسجة والخلايا النباتية

أ.د. محمود عبد الحكيم محمود | قسم البساتين (جامعة المنيا، مصر)



الدار العربية للنشر والتوزيع الحديثة

زراعة

الأنسجة والخلايا النباتية

تأليف
الاستاذ الدكتور
محمود عبد الحكيم محد
قسم البساتين جامعة المنيا – مصر

حقوق النشر

زراعة الأنسجة والخلايا النباتية

تأليف

الاستاذ الدكتور/ محمود عبد الحكيم محمود

رقم الإيداع: ٢٣١٢٨/ ٢٠١٦

978- 977- 258 – 424 – 2

للدار العربية للنشر والتوزيع الحديثة

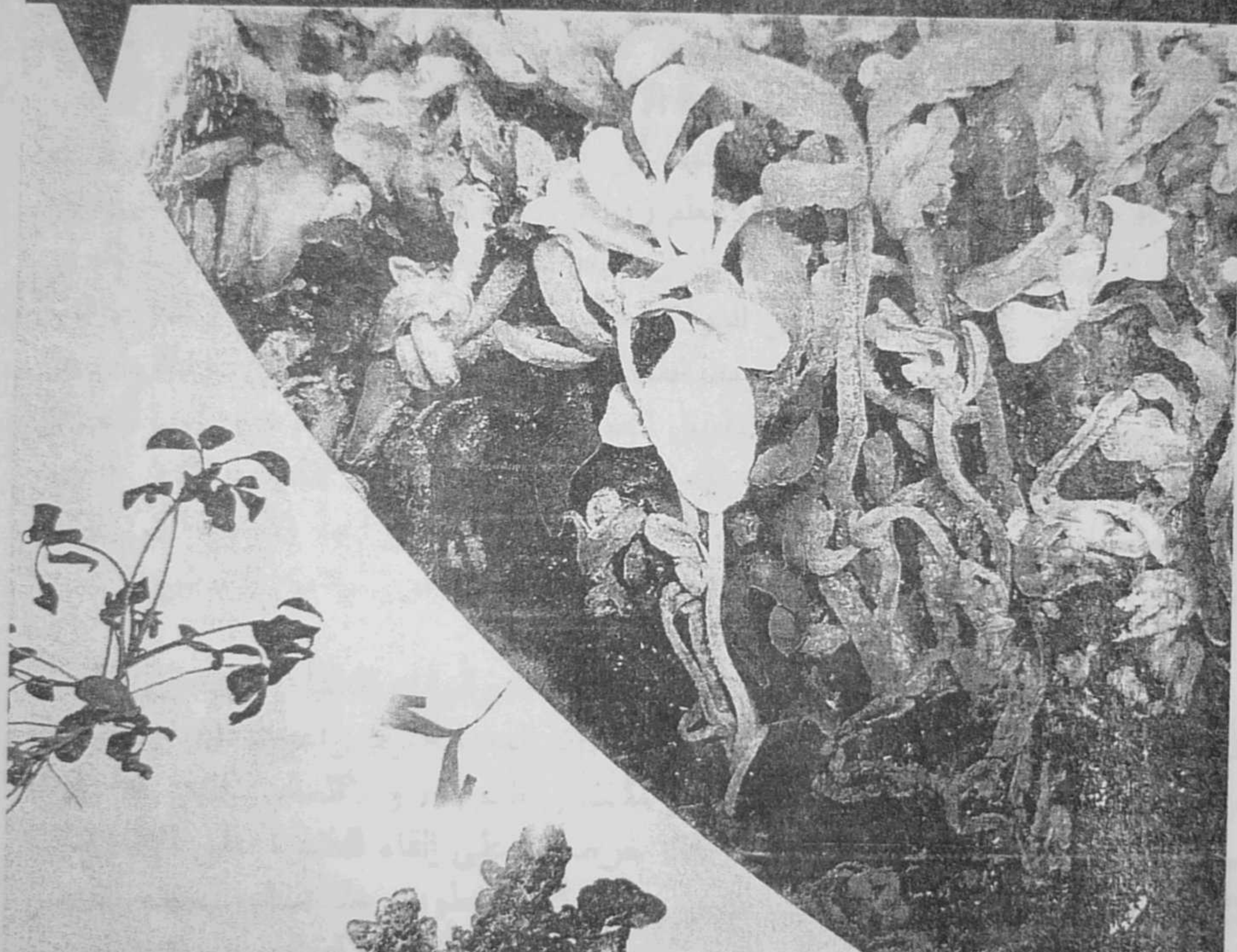
٧٧ ب طريق النصر بجوار طيبة مول – مدينة نصر

ت: ٢٤٠٥٠٥٢١

E_mail: aldar_alarabia1@yahoo.com

زراعة
الأنسجة والخلايا النباتية

أ.د.محمود عبد الحكيم محمود | قسم البساتين (جامعة المنيا ، مصر)



٢٠١٧

زراعة الأنسجة والخلايا النباتية

أ.د / محمود عبد الحكيم محمود
قسم البساتين - كلية الزراعة
جامعة المنيا

مقدمة

يعتمد الإنسان على الزراعة فى توفير احتياجاته الأساسية من الطعام والكساء. ومما لاشك فيه أن الزراعة التقليدية لا تفى كماً ولا نوعًا بحاجة الأعداد المتزايدة من البشر يوماً بعد يوم. وقد وضع الله سبحانه وتعالى أسراراً جليلة فى الخلية النباتية مكنت العلماء خلال العقدين الماضيين من تحسين إنتاجية المحاصيل الهامة لتتلاءم مع الكثيرمن المتطلبات الكمية والنوعية للإنسان. وذلك من خلال تطوير التقنية الحيوية واستخدامها فى الزراعة، والتى يُعلق عليها الكثير من الآمال فى حل مشكلة الغذاء العالمى وخصوصاً فى دول العالم النامى. ولأن زراعة الأنسجة هى إحدى الركائز الأساسية فى التطبيق العملى للتقنية الحيوية، فإن هذا الكتاب يستهدف توضيح الأسس العلمية لزراعة الأنسجة والخلايا النباتية معملياً مع الإشارة إلى كيفية الاستفادة منها فى المجال التطبيقى. دون إسهاب وقد خُصِصَ لذلك كتاب آخر وعلى الرغم من الحداثة النسبية لعلم زراعة الأنسجة فقد خرج سريعاً من عباءة البحوث المعملية إلى رحابة العمل التجارى. فبعد عدة عقود من محاولة العلماء تطوير هذا العلم اصبح الإكثار الدقيق فى الدول المتقدمة من الطرق الروتينية لإكثار العديد من النباتات الهامة بكميات كبيرة وبمواصفات جيدة. وبات من اليقين -وبالرغم من بعض المعوقات التى تحول دون التطبيق العملى للإكثار المعملى لبعض النباتات- أن الإكثار الدقيق له من المميزات ما يؤهله لأن يكون بديلاً للطرق التقليدية لإكثار العديد من الحاصلات الزراعية. ولا يمكن التغاضى عن دور زراعة الأنسجة فى تربية النبات وتحسين صفاته الوراثية والمحافظة على الأصول الوراثية من الإندثار.

وحتي يكون الكتاب أكثر فائدة لطلاب الدراسات العليا والمهتمين بالعمل التجارى تم الإشارة إلى حل الكثير من المشكلات المعملية وقد راعيت ذلك بالتفصيل فى الباب الرابع والخامس بالحديث عن مشكلتى التلوث، والأقلمة، واللتان قد تكونا سبب في فشل برنامج الإكثار برمته. كما حرصت على إلقاء الضوء على الإسهامات الإبداعية والفكرية لبعض العلماء الذين ساهموا فى تطوير هذا العلم، بهدف تشجيع طلاب الدراسات العليا على وجه الخصوص على التفكير فيما وراء المشاهدات الروتينية والنظريات العلمية. فعلى سبيل المثال كيف فكر ووُفق أحد طلاب الدراسات العليا مع استاذه فى تكوين أهم وسط مستعمل فى مزارع الأنسجة حتى الآن، وكيف أدرك بتجربة بسيطة فى إجرائها عميقة فى فكرها دور السيتوكينينات فى تنظيم النمو والتكشف.

وفي النهاية ما كان لهذا العمل أن يتم دون الاستفادة مما وفرته الجامعة من مصادر إلكترونية اتاحت لى الإطلاع على الكثير من الكتب الحديثة، والعشرات من الدوريات العلمية المتميزة. ومن خلال الدروس العملية والعديد من الأبحاث كونت مكتبة من الصور الرقمية ساهمت فى توضيح وفهم العديد من المواضيع فى متن الكتاب. كما تم إلقاء بعض الضوء على هذه التقنية وأهميتها في دعم وتوفير الغذاء، دون الخوض فى جدل قبول هذا أو رفض ذاك والتى قد يتسع لها كتاب آخر خاص بالتطبيقات العملية لزراعة الأنسجة والخلايا النباتية. والكتاب غني بالمراجع الحديثة و المقالات المرجعية لكثير من المواضيع حتى يتسنى لطلاب الدراسات العليا الرجوع إليها في حالة الرغبة للإستزادة.

وأتمنى من الله سبحانه وتعالى أن يكون هذا العمل المتواضع علماً نافعاً خالصاً لوجهه الكريم، وهو من وراء القصد.

أ.د/ محمود عبد الحكيم محمود

قسم البساتين- جامعة المنيا

إهداء

إلى روح والدى

فهرس المحتويات

الفصل الأول
التعريف بأنواع مزارع الأنسجة

الفصل الثاني
مكونات بيئات النمو المستعملة فى زراعة الأنسجة

الفصل الثالث
منظمات النمو النباتية ودورها فى زراعة الأنسجة ١٢٢

الفصل الأول

التعريف بمزارع الأنسجة

علم زراعة الأنسجة هو ذلك العلم الذى يهتم بتنمية الخلايا والأنسجة والأعضاء النباتية المُستأصلة من النبات الأم على بيئة اصطناعية تحت ظروف تعقيم فى المعمل. ويعتبر Schleiden & Schwann أول من وضعا الأساس العلمى لزراعة الأنسجة، وبالتالى التقنية الحيوية وإنتاج النباتات المحورة وراثياً. وذلك عندما اكتشفا النظرية الخلوية Cell theory والتى تفيد أن الخلية هى وحدة النبات الحى وأن نمو النبات يعنى تكوين مزيد من الخلايا. وقد طرحا نظريتهما للتكشف الذاتى totipotancy فى سنة ١٨٣٨ وهى تعنى ببساطة القدرة الوراثية الكامنة للخلية على تكوين جميع أنواع الخلايا النباتية الأخرى أو نبات كامل تحت ظروف معينة. وفى العام التالى أعلن Schwann أن الحيوانات تتكون أيضاً من وحدات بنائية هى الخلية. ومن الغريب أن نظرية تركيب الكائن الحى من وحدات تعرف بالخلية اهملت لفترة تصل إلى عقدين من الزمن. بل أن نظرية Schleiden واجهت اعتراضات كثيرة جداً لدرجة أنه أصيب بالاحباط واقلع عن العمل فى هذا المجال. أما نظرية قدرة الخلية على تكوين فرد كامل فقد أكدت صحتها بعد ذلك بفترة طويلة جداً وبالتحديد فى عام ١٨٧٨عندما أثبت Herman Vochting عملياً أن الإجزاء الصغيرة جداً من أنسجة النبات يمكن أن تنمو تحت ظروف خاصة.

أما التحقق الكامل لهذه النظرية فكان فى عام ١٩٥٤ عندما استطاع Muir مع فريقه البحثى من إنتاج أول كالوس ونبات بزراعة خلية فردية وبتقنية المزرعة الحاضنة. وكانت البداية الفعلية لهذا العلم فى بداية التسعينيات من القرن التاسع عشرعندما نشر العالم الألمانى Haberlandt نتائج محاولاته الأولى لزراعة خلايا كلاوربلاست بعض النباتات الزهرية على بيئة غذائية تتكون من سكر الجلوكوز والببتون وأملاح محلول Knop المغذى ونشر ذلك فى بحث بعنوان "Experiments on the culture of

isolated plant cells'. وعلى الرغم من فشل هذه المحاولات فى الحصول على انقسام خلوى وزيادة عدد الخلايا بسبب التلوث، وعدم توفيقه فى اختيار انسجة ملائمة لهذا الغرض إلا أنها كانت بمثابة بداية لتجارب أخرى ساهمت فى تقدم زراعة الأنسجة. وكان من استنتاجاته الهامة فى ذلك المضمار أن استعمال لبن جوز الهند ربما يساعد فى نمو الأنسجة المفصوله عن النبات الأصلي، وبالفعل كان لهذه الملاحظة تأثير فعال فى تطور زراعة الأنسجة بعد ذلك ومن الغريب أنه حتى الآن وبالرغم من التطور الكبير فى طرق التعقيم وتركيب بيئات ذات محتوى مناسب للعديد من صور النمو والتكشف للكثير من النباتات فمازال من الصعب دفع الأنسجة التى استعملها Haberlandet فى تجربته للنمو والتكشف. وكانت إشارته والتى لم تعتمد على تجارب مؤكدة إلى قدرة الخلية على تكوين نبات كامل تحت ظروف خاصة هى بداية علم زراعة الأنسجة.

وقد كان تفكيره سابقا عصره بما يقرب من قرن من الزمن حيث توقع فى ذلك الوقت أنه لن يكون من الغريب الحصول على جنين من خلية جسدية! فقد ترجم Vasil (2008) قوله *''To my knowledge, no systematically organized attempts to culture vegetative cells from higher plants in simple nutrient solutions have been made. Yet the results of such culture experiments should give some interesting insight into the properties and potentialities which the cell as an elementary organism possesses ...I am not making too bold a prediction if I point to the possibility that, in this way, one should successfully cultivate artificial embryos from vegetative cells''*. **ونجح Kotte فى عام ١٩٢٢ فى عزل وزراعة القمة النامية لجذور الذرة، لكنه فشل فى تقسيم وإعادة زراعة الجذور الناتجة، وهو ما نجح فيه Robbins فى نفس العام، لكن ماتت المزرعة بعد ذلك. وقد اعاق وجود وسط غذائى مناسب لنمو الأجزاء والأعضاء النباتية المختلفة تطور زراعة الأنسجة لفترة طويلة حيث استعمل الكثير من الباحثين**

محلول Knop اعتقاداً منهم أن حاجة الأنسجة المفصولة من العناصر الضرورية للنمو هى نفس حاجة النباتات فى المزارع المائية. لكن بالطبع النباتات فى المزارع المائية ذات قدرة على تخليق السكريات بعملية البناء الضوئى على العكس من النباتات فى مزارع الأنابيب على الأقل فى تلك الحقبة الأولى من زراعة الأنسجة.

أمكن فى عام ١٩٣٨ زراعة الجذور المفصولة من بعض النباتات فى بيئة معقمه بواسطة White. وواكب ذلك النجاح وبعده بعام واحد إمكانية تحول الخلايا المتكشفة إلى خلايا غير متكشفة تعرف باسم الكالس callus على يد كلا من Gautheret و Nobecourt و White . ويعتبر Hannig من الرواد الأوائل فى زراعة الأنسجة حيث نجح فى فترة الخمسينيات من القرن العشرين فى عزل أجنة غير ناضجة من بعض النباتات التابعة للعائلة الصليبية وزراعتها فى وسط مغذى للحصول على نباتات كاملة. وتبع ذلك تقدماً سريعاً حيث أمكن زراعة الخلايا الفردية لبعض النباتات وكذلك عزل البروتوبلاست وزراعته والتهجين بين أنواع نباتية مختلفة كان من الصعب إجرائه بالطرق التقليدية المعروفة فى تربية النبات. وكان جُل التقدم الحادث فى علم زراعة الأنسجة راجعاً لاكتشاف منظمات النمو النباتية خاصة الأوكسينات والسيتوكينينات ودورهما فى التحكم فى نمو وانقسام وتكشف الخلايا. وتعد عملية نقل الجينات من مصادر متباينة نباتية أوغير نباتية إلى الخلايا النباتية بطرق مختلفة ثم دفع تلك الخلايا إلى تكوين نباتات تحمل الصفة الجديدة أو ما يعرف بالنباتات المحورة وراثياً من أحدث تطورات هذا العلم والتى انجزت فى عام ١٩٨٣. ولم يستغرق الأمر زمناً طويل نسبياً لزراعة النباتات المحورة وراثياً والناتجة من مزارع الأنسجة بشكل تجارى. حيث يشير James (2015) إلى الزيادة المضطردة فى زراعة النباتات المعدلة وراثياً حتى وصلت ١٨٠ مليون هكتار (١٠٠٠٠ م٢) فى عام ٢٠١٥ موزعة فى ٢٩ دولة.

ومنذ بداية الثمانينيات فى القرن الماضى انتقل علم زراعة الأنسجة بوتيرة سريعة جداً من المجال الاكاديمى إلى المجال التطبيقى فى الدول المتقدمة حيث تزايد عدد الشركات العاملة فى هذا المجال والتى تنوعت بين مجرد إكثار النباتات إلى استخدامها فى برامج التربية، وكذلك فى إنتاج العقاقير الطبية معملياً. وقد قُدر الإنتاج العالمى من الشتلات الناتجة بتقنية الزراعة فى الأنابيب بحوالى ٥٠٠ مليون إلى مليار نبات سنوياً وباستخدام ما يصل إلى ٥٠ الف صنف نباتى (Baran & Biswajit, 2005). ويوجد بالفعل فى العديد من الدول العربية كمصر وسوريا والمملكة العربية السعودية بعض المؤسسات الحكومية والخاصة التى تعمل فى مجال إكثار النباتات بتقنية زراعة الأنسجة لكن فى عدد محدود من الأنواع النباتية أهمها الموز ونخيل البلح والفراولة وبعض نباتات الزينة.

يستعمل مصطلح tissue culture من الناحية الأكاديمية للدلالة على طُرز متباينة من الزراعة المعملية أو ما يعرف بـ *In vitro culture* والتى تعنى حرفياً in a glass حيث أن الزراعة كانت تتم غالباً فى أنابيب اختبار أو ما شابه ذلك وهو عكس *In vivo* الذى يعنى داخل الكائن الحى. وفى الحقيقة فإن مصطلح tissue culture يعنى زراعة الكالس فقط أو ما يعرف بـ callus culture دون باقى أنواع مزارع الأنسجة (George, 2008) . وعموماً لا تشتمل زراعة الأنسجة بالمعنى الشائع زراعة الأنسجة النباتية فقط لكن تعنى أيضاً زراعة أى جزء تم فصله من النبات ويسمى المُستأصَل النباتى explant سواء كان خلية أو نسيج أو حتى عضو كامل.

ويجب الإشارة إلى أن الخلايا النباتية خاصة الميرستيمية وهى خلايا غير متميزة أو غير متكشفة non-differentaited لها القدرة على التشكيل أو التطور لتكوين نبات كامل على العكس من الخلايا الحيوانية. وربما تمتلك الخلايا المتميزة أو المتكشفة differeniated أى تلك التى لها شكل أو وظيفة فسيولوجية محددة القدرة -على الأقل من

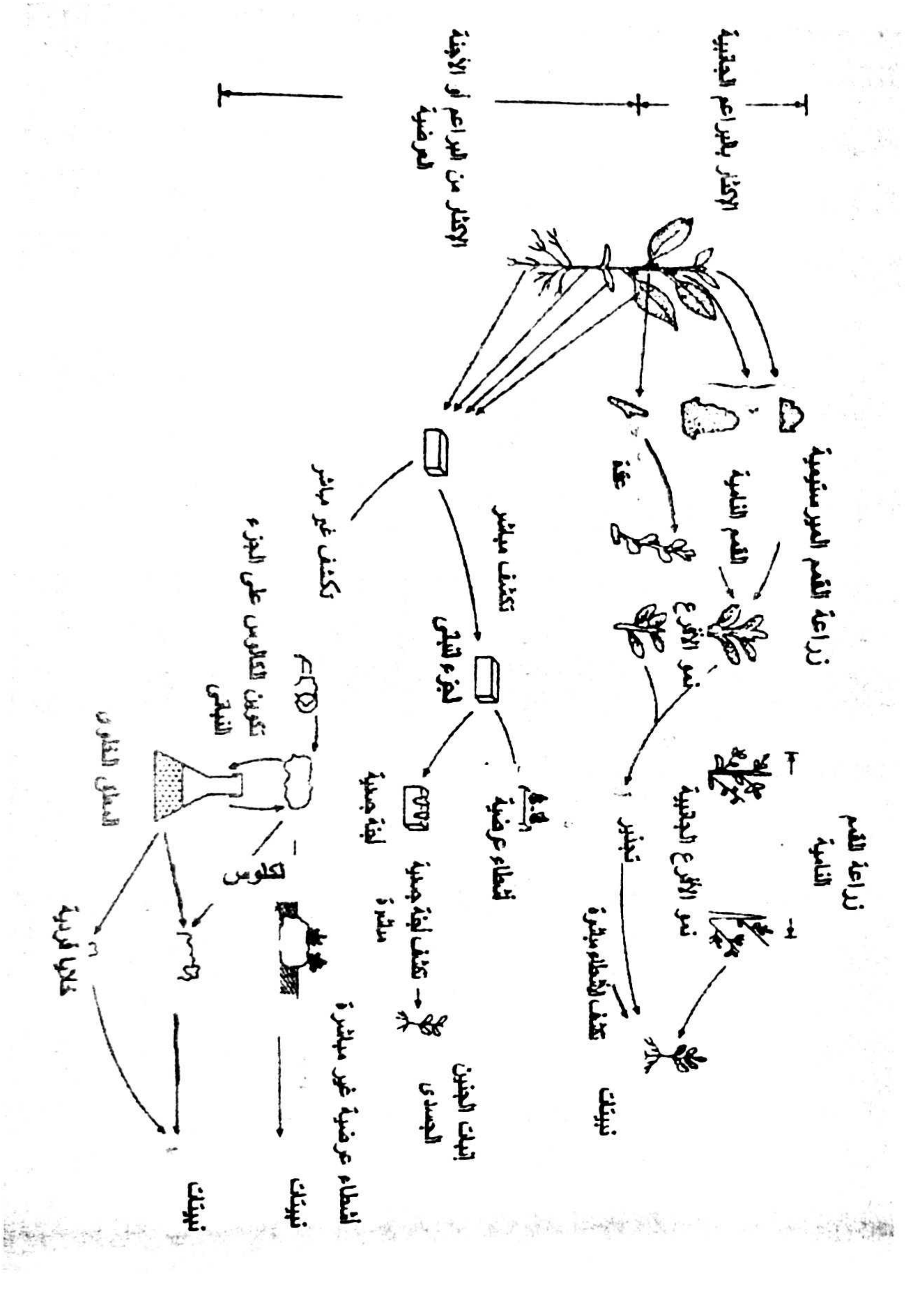
الناحية النظرية- على إعادة عملية التشكيل أو التطور مرة أخرى لكن بعد الارتداد إلى الحالة الميرستيمية طبقاً لنظرية totipotancy. وقد يستعمل مصطلح micropropagation للدلالة على زراعة الأنسجة وإن كان يعنى الإكثار الدقيق فقط حيث يتم التعامل مع نباتات أو أجزاء غاية فى الدقة. وفيما يلى عرض سريع لأنواع مزارع الأنسجة النباتية وسوف يتم الحديث عنها بالتفصيل فى أجزاء أخرى من هذا الكتاب، والهدف من ذلك هو التعريف العام بها باعتبار أن ذلك أساسيًا فى التعرض للأبواب التالية.

أنواع مزارع الأنسجة النباتية

هناك عدة أنواع من مزارع الأنسجة كما يبينها شكل رقم (١-١) ويتوقف الدافع من استعمال نوع محدد منها على الهدف المنشود من عملية الزراعة. فعلى سبيل المثال تستعمل زراعة القمم الميرستيمية بغرض الحصول على نباتات عديدة خالية من الفيروس، بينما تستعمل العقد الساقية لغرض الإكثار الدقيق، ومزارع المتك للحصول على نباتات احادية العدد الكروموسومى. وتقسم أنواع مزارع الأنسجة إلى نوعين أساسين هما:

أولاً: مزارع الأنسجة المتكشفة أو مزارع الأعضاء Differentiated or Organized culture

وقد يطلق عليها أيضا المزارع المتميزة أو المتشكلة وهى تعنى زراعة أعضاء نباتية كاملة التكوين كالبراعم، والأجنة، والجذور أو أعضاء فى بدء تكوينها كالقمم النامية للسوق أو الجذور أو مبادئ الأوراق والأزهار وذلك بعد فصلها من النبات الأم أو عقب تكوينها من زراعة مستأصل نباتى آخر. والهدف من تلك المزارع هو دفع هذه الأجزاء لاستكمال نموها بنفس النمط كما لو كانت متصلة بالنبات الأم إما بغرض بعض الدراسات كتتبع عملية الإخصاب أو بغرض الإكثار **ويضم هذا القسم عدد من الأنواع هي:**



شكل ١-١: أنواع مزارع الأنسجة المستعملة لإكثار النباتات (معدل عن George, 1993)

١. **زراعة القمم الميرستيمية Meristim culture**: وهى عزل جزء صغير جداً من القمة النامية لا يتجاوز طوله ٠.٤ مم وعرضه حوالى ٠.١ مم مع واحدة أو اثنين فقط من مبادئ الأوراق، ولذا تصنف ضمن مزارع الأنسجة المتكشفة، وإن كانت بعض المراجع تصنفها ضمن المزارع غير المتكشفة وزراعته فى وسط غذائى معين ليعطى نباتاً واحداً غالباً. وتستعمل هذه الطريقة للحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية، وإكثار بعض النباتات الأخرى مثل الاوركيد. ويجب أن تستهل زراعة الأنسجة فى النباتات المصابة بالفيروسات أو تلك المعروفة بحساسيتها العالية للفيروسات كالموز والبطاطس والداليا بزراعة القمم الميرستيمية مع إجراء أختبارات للتأكد من خلو النباتات الناتجة من تلك الفيروسات قبل استعمالها للإكثار المعملى بالطرق الأخرى.

٢. **زراعة القمم النامية Shoot tip culture**: وهى عزل جزء صغير من القمة النامية مع عدد قليل من مبادئ الأوراق وزراعته فى وسط غذائى ليعطى نباتاً واحداً أو أكثربشرط أن تكون من براعم سابقة التكوين على النبات الأم. وبذلك تعتبر من طرق حفظ الأصول الوراثية. وتعد زراعة القمم الميرستيمية والقمم النامية من أكثر أنواع مزارع الأنسجة استعمالاً.

٣. **زراعة العقد الساقية Stem node culture**: وفيها يقسم الساق إلى عدة أجزاء يحتوى كل منها على عقدة بها برعم واحد أو أكثر فينمو كل برعم مكوناً ساقاً. وتستعمل طريقتى القمة النامية والعقد الساقية للإكثار التجارى للعديد من النباتات.

٤. **زراعة الأجنة Embryo culture**: وفيها يعزل الجنين عن اغلفة البذرة أو الثمرة فى مرحلة مبكرة بعد الإخصاب أو عقب تمام تكوينه ثم يكمل نموه ويعطى نباتاً. وتستعمل هذه الطريقة للتغلب على بعض المشاكل التى تؤدى إلى موت الجنين بعد عمليات التلقيح والإخصاب وكذلك فى تقصير دورة التربية لبعض النباتات. ويجب

عدم الخلط بين مزارع الأجنة والأجنة الجسدية حيث تتكون الأخيرة بعد زراعة المُستأصَل النباتي معمليا.

٥. **زراعة الجذور** Root culture: حيث تفصل الجذور وتزرع في وسط النمو وتستعمل هذه الطريقة غالبا للحصول على المواد الطبية الفعالة معمليا.

٦. **زراعة المبايض والأزهار المفصولة** Ovules and excised flowers culture: تفصل المبايض فقط أو الزهرة كاملة وتزرع في الوسط الغذائي بهدف التغلب على بعض المشاكل الناتجة عقب الإخصاب كسقوط الأزهار قبل تمام تكوين الجنين كذلك لإحداث الاخصاب المعملي.

٧. **زراعة المتك** Anther culture: وفيها يزرع المتك المحتوى على حبوب لقاح كاملة التكوين أو الخلايا الأمية لحبوب اللقاح microspors لتكوين أفراد أحادية التركيب الوراثي ويتم ذلك بتكوين أجنة جسدية أي جنين يشبه الجنين الجنسي لكن بدون حدوث عمليتي التلقيح والإخصاب. وقد يحدث ذلك مباشرة من المُستأصَل النباتي أو تتكون النباتات بطريقة غير مباشرة عقب تكوين الكالس. وقد يتم زراعة حبوب اللقاح لنفس الغرض والتي تسمى pollen grain (microspore) culture. وربما يصنف البعض زراعة المتك على أنها من ضمن المزارع غير المتكشفة.

ثانيا: المزارع غير المتكشفة Non-differentiated or Non-organized culture

يتكون النبات الكامل من عدة أعضاء وكل عضو يتكون من مجموعه من الأنسجة المتخصصة من حيث الشكل الظاهري أو التشريحي أو الوظيفي، أي أن كل نسيج في العضو متحور للقيام بدور معين ويطلق على ذلك التحور عملية التكشف differentiation. فالورقة على سبيل المثال تتكون من عدة أنسجة كل نسيج يتكون من خلايا ذات مواصفات محددة ولكل منها شكل ودور محدد. وغالبا يندر وجود صور من

النمو غير المتخصص فى الطبيعة ومن أمثلتها الأورام الناتجة عند إصابة بعض أنواع النباتات بأنواع من البكتيريا كمرض التدرن التاجى الناتج من الإصابة بكتيريا *Agrobacterium tumefaciens*. لكن هذه الصورة من عدم التكشف شائعة فى زراعة الأنسجة حيث تتحول الأنسجة المتكشفة إلى أنسجة غير متكشفة تعرف باسم الكالس callus. ولا يحتوى الكالس على تراكيب مميزة على الأقل فى بداية تكوينه بل على عدد غير محدد من الخلايا غير المتكشفة والتى تشبه الورم. وقد يكون من الصعب المحافظة على نمو الخلايا المتكشفة فى زراعة الأنسجة دون ارتدادها إلى الصورة غير المتكشفة أى الميرستيمية التى لها القدرة على النمو والانقسام لمدة طويلة فى بيئة شبه صلبة أو سائلة. وبصورة عامة لا يفضل استعمال هذا النوع من المزارع فى عمليات الإكثار لتفادى حدوث تغييرات وراثية فى النسل الناتج، لكن لهذه المزارع أهمية كبيرة فى برامج التحسين الوراثى. ويضم هذا القسم عدة أنواع من مزارع الأنسجة وهى:

١. **زراعة الكالس Callusculture**: وهى زراعة ونمو كتل من الخلايا غير المتكشفة التى تنتج من نمو نسيج متكشف أو غير متكشف من عضو نباتى. وتستخدم هذه الطريقة فى انتخاب نباتات ذات صفات معينة وإنتاج معلق الخلايا.

٢. **زراعة معلق الخلايا Cell suspension culture**: وهى تشير إلى زراعة الخلايا فى صورة فردية أو كتل صغيرة منها فى وسط غذائى سائل مع ضمان وجود تهوية بطريقة ما لهذه المزارع. والغرض الأساسى من هذا النوع هو إنتاج المواد الفعالة أو الثانوية معملياً، بالإضافة لاستخدامها كوسيلة لانتخاب نباتات ذات صفات فريدة. ويعتبر Bergmann أول من استطاع الحصول على معلق الخلايا الفردية من نبات الدخان فى سنة ١٩٦٠.

٣. **زراعة البروتوبلاست Protoplast culture:** عبارة عن نزع الجدار الخلوى للخلية وزراعة الخلية عارية منه، فما يلبث أن يتم اعادة تكوين الجدار الخلوى

وانقسام الخلية لتكون الكالس الذى يمكن أن يتكشف منه الأشطاء أو الأجنة الجسدية. وتستخدم مزارع البروتوبلاست وهى من احدث تقنيات زراعة الأنسجة فى إجراء التهجين بين أنواع نباتية يصعب التهجين بينها فى الطبيعة. وبالفعل نجح العديد من العلماء فى الحصول على هجن نوعية جديدة وهجن من نباتات عقيمة كالنباتات إحادية وثلاثية العدد الكرموسومى. ولزراعة المعلق الخلوى والبروتوبلاست أهمية كبيرة فى دراسة فسيولوجيا النبات وعلاقة الأمراض والطفيليات المختلفة به وكذلك عمليات النقل الجينى والتحول الوراثى Transformation للحصول على أفراد تحمل صفات ربما من أصل غير نباتى.

لمحة تاريخية

بعد هذا التعريف السريع لأنواع مزارع الأنسجة يجدر بنا إلقاء الضوء على التطور التاريخى لعلم زراعة الأنسجة والإشارة إلى بعض العلماء الذين ساهموا فى تقدم هذا العلم (جدول رقم ١-١). ولمزيد من المعلومات حول هذا الموضوع وأهمية زراعة الأنسجة والمصطلحات الأساسية الخاصة بتعريف زراعة الأنسجة يمكن الرجوع إلى بعض الكتب والمقالات المرجعية مثل Pierik (1987) و George (1993) و Biswajit (2005) و Baran & Vasil (2008) وكذلك الموقع www.kitchenculturekit.com/history_TC.htm على شبكة المعلومات الدولية. أما زراعة الأنسجة كلبنة أساسية فى التقنية الحيوية فقد تناولها Gamborge (2002).

وعموماً يمكن دفع الأنسجة فى الزراعة المعملية إلى تكوين أعضاء جديدة لم تكن موجودة بالأصل والتى تعرف بالأعضاء العرضية adventives أو adventitious وذلك عبر التحكم فى نشاط الجينات المنوط بها دفع الخلية للتكشف. ويطلق على هذه العملية التكوين الشكلى Morphogenesis أو تكوين الأعضاء Organogenesis. ويطلق على عملية التكوين الشكلى للأشطاء من الكالس Caulogenesis أما تكوين الجذور

فيعرف Rhizogenesis. وأحياناً نلاحظ تكوين أوراق عرضية من الكالس دون تكوين الأشطاء لكن إعادة تشكيل الأوراق تعني تكوين القمم الميرستيمية التي ربما فشلت في النمو. وقد يرتبط تكشف الخلية بتطور العضو الموجودة به وعند ذلك يكون الفعل الجيني المسئول عن تطور العضو أساسياً لتكشف الخلية. فعلى سبيل المثال اللون المميز للأزهار مرتبط بحدوث تطور العضو الزهري، فلو أعيق تطور البرعم الزهري لأي سبب من الأسباب فلن يحدث تحول في لون البلاستيدات المسئولة عن التلوين.

جدول ١-١: بعض الملامح الأساسية في تطور علم زراعة الأنسجة.

العام	الباحث	الإسهام
١٩٠٢	Haberlandt	أول محاولة لزراعة الأنسجة
١٩٠٤	Hannig	نجاح زراعة الأجنة لبعض النباتات
١٩٢٢	Robbins	نجاح زراعة قمم الجذور
١٩٣٣	Nobcourt & White	النجاح في الحصول على كالوس مستمر في النمو
١٩٤٢	Gautheret	ملاحظة إنتاج المركبات الثانوية في مزارع الخلايا
١٩٤٤	Skoog	دراسة تكشف البراعم العرضية للدخان معملياً
١٩٤٥	Loo	زراعة القمة النامية لنبات الأسبرجس
١٩٤٦	Ball	الحصول على أول نبات كامل من زراعة القمة النامية لنباتات *Lupinus* و *Tropaeolum*
١٩٤٨	Shoog & Tsui	إثبات أن الأكسين/الأدنين عامل هام في تكشف البراعم والجذور في أوراق الدخان
١٩٤٩	Nitsch	زراعة الثمار كاملة
١٩٥٢	Morel & Martin	إنتاج نباتات Dahlia خالية من الفيروس باستعمال القمة الميرستيمية
١٩٥٣	Tulecke	الحصول على نباتات Ginkgo أحادية بزراعة حبوب اللقاح
١٩٥٤	Muir *et al.*	إنتاج أول نبات من خلية فردية
١٩٥٥	Miller *et al.*	اكتشاف دور الكينيتين في الانقسام الخلوي
١٩٥٧	Skoog & Miller	اكتشاف دور الأوكسينات/السيتوكينينات في تنظيم تكشف البراعم والجذور

تابع جدول ١-١

١٩٥٨	Maheshwari & Rangaswamy	الحصول على جنين لاجنسى من زراعة نسيج النيوسيلة
١٩٦٠	Kanata	النجاح فى إحداث الإخصاب فى أنبوبة اختبار
١٩٦٠	Morel	إكثار الأوركيد بالقمم الميرستيمية
١٩٦٢	Murashige and Skoog	تحضير اكثر البيئات استعمالا فى زراعة الأنسجة
١٩٦٤	Maheshwari & Guha	إنتاج أول نبات أحادى بزراعة حبوب لقاح الداتورة
١٩٧٠	Power *et al.*	أول محاولة ناجحة لدمج البروتوبلاست
١٩٧٥	Gengenbach & Green	الحصول على نبات ذرة مقاوم لفطر الذبول بزراعة الكالس
١٩٧٨	Melcher *et al.*	التهجين الجسدى بين الطماطم والبطاطس
١٩٨١	Scowcroft & Larkin	استحداث مصطلح التغيرات الجسمية
١٩٨٤	Paszkowski *et al.*	إدخال الحامض النووى البلازميدى إلى الخلية
١٩٨٥	Horsh *et al.*	استعمال *Agrobacterium* لتحوير النباتات وراثياً

وفى حالة استخدام زراعة الأنسجة لإنتاج بعض المركبات الثانوية يكون من الضرورى حدوث تكشف للخلايا بل وتكوين أعضاء كاملة إذا كان تخليق تلك المركبات يتم فى ذلك العضو. ويلاحظ أن الخلية فى زراعة الأنسجة توجد فى ظروف بيئية خاصة مختلفة تماماً عن تلك الموجودة فى الظروف العادية، فالخلية فى النبات النامى فى الظروف الطبيعية تكون متأثرة بدرجة عالية بالنظام الوراثى المتحكم فى الصفة والموجود ضمن الجينوم، بالإضافة إلى وجود اتصال بين الخلايا فى النسيج الواحد عن طريق الخيوط البلازمودزماتية. وبالتالى تتأثر الخلايا ببعضها البعض، فالمركبات الهامة فى النمو والتطور كهرمونات النمو لا تخلق فى كل الخلايا بل فى خلايا محددة وتنتقل خلال النبات بطرق مختلفة لتؤثر فى خلايا أخرى. أما فى المعلق الخلوى بالتحديد ونظراً لوجود الخلايا بصورة غير مترابطة والحركة المستمرة للمعلق الخلوى بغرض التهوية فإن تأثر الخلية بالخلايا المجاورة ينخفض. أضف إلى ذلك أن الظروف البيئية تكون

مختلفة مما يؤثر فى النظام الوراثى المتحكم فى عمليات النمو والتكشف طبقاً للقاعدة المعروفة بأن الطرز المظهرى هو محصلة الطرز الوراثى والظروف البيئية والتفاعل بين الإثنين.

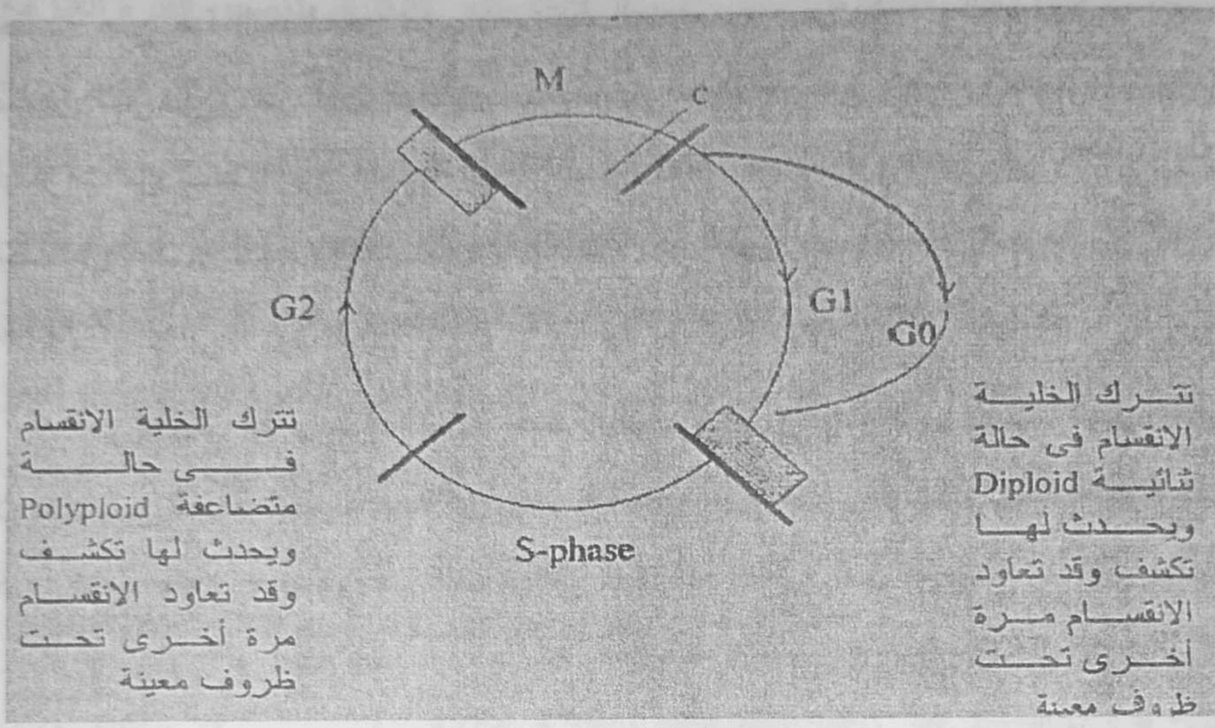
وبهذا يتضح أنه قد توجد صعوبة فى المحافظة على التكشف الموجود فى النسيج فى زراعة الأنسجة. فمثلاً أمكن المحافظة على خلايا الميزوفيل الموجودة فى كلوربلاست الخلايا البرانشيمية لبعض النباتات فى هذه الصورة المتكشفة من حيث الحجم والشكل واللون لمدة ١٦٨ ساعة فقط، وبعدها أصبحت الكلوروبلاستيدات شاحبة وتوزيعها غير منتظم وبدأت الخلايا فى الانقسام أى الارتداد إلى الحالة غير المتكشفة. كما أن الخلايا المتكشفة معملياً قد لا تتشابه مع الخلايا المقابلة لها فى النباتات العادية. فرغم أن الأوراق المتكونة فى زراعة الأنسجة تحتوى على خلايا الثغور لكن هذه الثغور لا تقوم بالدور المعروف فى النبات الطبيعى، كذلك قد تكون الجذور المتكونة على النباتات معملياً غير فعالة وظيفياً (Chandar*et al.*, 2010).

دورة الخلية وارتباط ذلك بزراعة الأنسجة

بالرغم أن هناك العديد من التعريفات التى تدور حول النمو لكن من الثابت أن النمو فى النباتات الراقية يتم بزيادة عدد الخلايا أو حجمها أو كليهما معاً. وقد لا يكون هناك حد فاصل بين هاتين العمليتين ففى مناطق القمم النامية يحدث انقسام الخلايا فى بضع مليمترات من القمة النامية والتى يليها منطقة الاستطالة حيث تزيد الخلايا فى الحجم. أما فى الأعضاء النباتية كالأوراق واللحاء فإن عمليتى الانقسام والاستطالة تحدثان فى نفس المكان وقد تتزامنان. وتمر الخلية أثناء الانقسام بعدة مراحل هى M, G1, S, G2 (الشكل رقم ١-٢). وتؤدى كل مرحلة من هذه المراحل إلى حدوث المرحلة التالية، وتتكرر هذه المراحل فى كل دورة من دورات الانقسام الخلوى. وتعرف الفترة التى تستغرقها الخلية من بداية الانقسام حتى نهاية الانقسام الثانى بدورة الخلية.

تنقسم الخلية انقساماً ميتوزياً (M) mitosis ينتج عنه غالباً خليتين متشابهتين. وقبل أن تنقسم الخلية مرة أخرى تمر بمرحلة تسمى مرحلة التهيؤ الأول gap1 (G1) ويسمي.(post-mitotic interphase) وخلال هذه الفترة يتم معظم النمو الضرورى لعضيات الخلية المختلفة وكذلك السيتوبلازم. وتقود هذه العملية إلى مرحلة أخرى تسمى مرحلة التخليق (S) synthesis حيث يتم خلالها تضاعف محتوى الخلية من المادة الوراثية المعروفة بالحامض النووى الديوكسى ريبوز DNA وبنهاية هذه المرحلة يكون كل كروموسوم مكون من كروماتيدتين واضحتين. وبعد طور التخليق تأتى مرحلة التهيؤ الثانية وتسمي gap2 (G2) post-synthetic قبل أن تدخل الخلية فى الانقسام الميتوزى مرة أخرى وفى الظروف الطبيعية يكون زمن كل مرحلة من المراحلS و M وG2 ثابتاً أما الزمن الذى تستغرقه الخلية فى المرحلة G1 فهو متباين.

وتفترض إحدى النظريات المفسرة لدورة الخلية أن هناك نقاط تحكم أساسية فى هذه الدورة، ويتم تخليق المواد المتحكمة فى تلك النقاط فى المرحلتينG1 و G2. وتتوقف الخلية عن الانقسام فى هاتين المرحلتين إذا كانت هذه المواد غير كافية. وبإعادة تخليق هذه المواد مرة أخرى تعاود الخلية الانقسام من جديد ويكون دور زراعة الأنسجة آنذاك هو العمل على استحثاث تكوين تلك المواد فى الخلايا التى تحولت إلى الحالة المتكشفة. وبتوقف انقسام الخلية تنشط العمليات الدافعة للتكشف وتكوين أعضاء جديدة. ويفترض البعض أن الخلية التى دخلت فى مرحلة التكشف تتوقف عن النمو فى مرحلة تعرف بـ G0 والتى قد تحدث قبل أو عقب الانقسام الميتوزى فإذا حدثت بعده تكون الخلايا ثنائية العدد الكروموسومى أما إذا حدثت بعد طور التهيؤ الأول وقبل الانقسام الميتوزى مباشرة فإن الخلية ستكون متضاعفة العدد الكروموسومى. والمفترض أن تسبق هذه المرحلة مرحلة الطور اللاجى (lag) الذى يؤهل الخلية للدخول فى مرحلة التخليق.



شكل ١-٢: دورة خلية الكائنات الراقية بدءاً من الطور الميتوزي (-M) Mitosis ثم Cytokinesis (C) ويليه post-mitotic interphase (G1) و post-synthetic interphase (G2) أما S-phase فهى مرحلة تخليق الحامض النووى. تشير الأجزاء المظللة إلى الأماكن الأساسية لتحكم البروتين في الدورة (Francis & Sorrell, 2001).

ويحتاج التكشف لتخليق الـ DNA الموجود فى النواة والعضيات الأخرى، فإن كان هناك انقساماً خلوياً سابقاً فإن هذا التخليق يحدث فى طور الـ S-phase . أما فى حالة حدوث التكشف دون الانقسام فإن تخليق المادة الوراثية يتم عن طريق التضاعف الذاتى amplification وendopolypliodisation للجينات المسئولة عن هذا التكشف. وهناك بعض الصور من التطور للأعضاء كتكوين عناصر الخشب الناقصة Tracheids التى تتم بحدوث تضاعف فى عدد الكروموسومات والمادة الوراثية دون انقسام النواة لعدم تكون خيوط المغزل ويعرف ذلك بالتضاعف الداخلى endoreduplication أو endopolyploidy أو endomitosis. والجدير بالذكر أنه إذا استعملت أنسجة محتوية على خلايا بها هذه الصور من التضاعف فإن النباتات التى ربما تتكشف منها ستكون

محتوية على هذا التضاعف. لكن لا يرتبط العديد من صورتكشف الخلايا كالاستطالة وتكوين الأزهار وتغير لون البلاستيدات بانقسام الخلايا، حيث يحدث التكشف فى بضع مليمترات من الخلايا دون الحاجة إلى الانقسام. فمثلا السيوبرين يتكون فى خلايا درنات البطاطس عند جرحها، وكذلك الأوعية الناقلة تتكون فى الأنسجة دون الحاجة إلى انقسام الخلايا.

ويلاحظ أن بعض الخلايا عالية التخصص تبدو وكأنها فقدت القدرة على الارتداد إلى الحالة الميرستيمية أى عدم التكشف مرة أخرى وبذلك فقدت القدرة على تكوين نبات جديد. ويطلق على الخلايا التى لها القدرة على التكشف لعضو ما كأن تكون أشطاء أو جذور أو أجنة جسدية بأنها خلايا مؤهلة competent cells وقد تكون الخلية مؤهلة للتكشف لعضو محدد من الأعضاء السابقة دون الآخر وتسمى الخلية فى هذه الحالة بالخلية المحددة determined cell. فخلايا القمم الميرستيمية للسوق مؤهلة لأن تتكشف إلى خلايا ساق أما خلايا القمم الميرستيمية للجذر فهى مؤهلة لأن تعطى خلايا جذر. لكن حتى وإن كانت الخلية مؤهلة للتكشف فلابد أن تتوفر الظروف التى تدفع الخلية للتكشف كما سبق الذكر. ويمكن بالتحكم فى الظروف الخارجية تعديل تأهيل الخلية فيمكن للخلايا الميرستيمية المفصولة من القمم النامية للسوق أن تعطى جذور والعكس صحيح. وتلعب منظمات النمو خاصة الأوكسينات والسيتوكينينات معاً الدور الأعظم فى هذه العملية (Tao & Verbelen, 1996) . ولكل مجموعة دوراً مكملاً للآخر فالاكسين يعمل على تضاعف الحامض النووى بينما للسيتوكينينات دوراً أساسياً فى عملية الانقسام الخلوى سواء فى النبات الكامل أو فى زراعة الأنسجة ولا تدخل الخلية فى الانقسام الخلوى إلا إذا توفرت السيتوكينينات. ويتطلب انقسام الخلايا تناسق بين طور التخليق (S) والانقسام الميتوزى (M) ومن ثم يجب ملاحظة مستوى كلاً من الأوكسينات والسيتوكينيات بدقة فى بيئة زراعة الأنسجة فنقص الأوكسينات أثناء طور التهيؤ الثانى (G2) يسبب ايقاف انقسام معلق خلايا الدخان (Koenset *al.*, 1995).

ويعمل منظم النمو 2iP على تقصير فترة طور التخليق بتقصير الفترة اللازمة لمضاعفة الحامض النووى. وللكينيتين دور فى تنظيم عملية الفسفرة الضرورية لتخليق(Cdk) cycline-dependent kinase المتحكم فى الإنتقال من مرحلة التهيؤ الثانية إلى الانقسام. ويعتقد أن هناك ارتباطا وثيقا بين السيتوكينينات والبروتينات المشتركة فى تضاعف الحامض النووى فى مرحلة التخليق. وقد وجد Suda *et al.* (2009) أن إضافة ١٠ ميكرولتر من منظم النمو السيتوكينينى المعروف بالبنزيل ادنين تثبط انقسام معلق خلايا الدخان، حيث لم تدخل الخلايا فى طور التهيؤ الثانى بعد المعاملة بساعات قليلة. كذلك تم ايقاف أو تعطيل (على أساس التركيز المستعمل) دورة الخلايا التى كانت فى مرحلة الانقسام الميتوزى. وقد سببت المعاملة موت بعض الخلايا بعد ١٦ ساعة من المعاملة. هذا وقد سُجل تأثير مختلف للسيتوكينينات المختلفة على الانقسام والنمو فى هذه الدراسة. ولمنظمات النمو الأخرى دوراً فى تنظيم دورة الخلية. فهرمون الزياتين يعمل على تنشيط بعض الجينات المتحكمة فى الانقسام الخلوى ودورة الخلية فى نبات Arabidopsis بطريقة تشبه فعل عامل النمو المعروف بـ D cycline فى الثدييات. وفى الأرز يعمل حمض الجبريلك (GA_3) على استطالة السلاميات وقد يرجع ذلك على الأقل جزئيا إلى دوره فى تخليق Cdk أثناء الانتقال من مرحلة التهيؤ الثانية إلى الانقسام الميتوزى، أما الدور المثبط لحامض الأبسيسك (ABA) على النمو فقد يرجع إلى تثبيط تخليق Cdk. وللمزيد من المعلومات حول هذا الموضوع يمكن الرجوع إلى Dewitte *et al.* (2003).

وعلى الرغم من قدرة بعض منظمات النمو على إحداث التكشف المباشر للأعضاء إلا أن بعض الخلايا فى بعض الأجزاء النباتية يكون تم تحديدها مسبقاً بصورة جزئية لتسلك مسلكاً معيناً من مسالك التكشف كأن determination تتطور إلى أجنة جسدية، ومن ثم فإنها تحتاج لتغير بسيط فى الظروف المحيطة لتبدأ التكشف. ويكون هناك احتمالاً عالياً للحصول على أجنة جسدية من هذه الخلايا بالتكشف

المباشر وغير المباشر. وتختلف نسبة الخلايا المؤهلة والمحددة وراثياً من نسيج لآخر داخل نفس النبات، وبالطبع يكون التباين أوسع بين الأنواع المختلفة. ويعد هذا أحد أسباب اختلاف استجابة الأنواع والأصناف المختلفة للتكشف فى زراعة الأنسجة. وفى بعض الحالات رغم وجود عدد كبير من الخلايا المؤهلة والمحددة وراثياً للتكشف فإن بعضها يسلك هذا المسلك. ويرجع ذلك إلى أن الخلايا التى تدخل أولا فى هذا المسلك ترسل إشارات تثبيطية للخلايا الأخرى ويفسر ذلك زيادة عدد الأشطاء المتكونة أحيانا عندما تفصل البراعم العرضية التى تتكون أولا على المُستأصَل النباتى. ومن ثم يمكن القول أن كون الخلية مؤهلة أى بمعنى آخر التركيب الوراثى للخلية هو الأساس فى زراعة الأنسجة. ففى التكشف المباشر وغير المباشر يتم تكوين الأعضاء من خلايا مؤهلة ميرستيمية أو ارتدت إلى الحالة الميرستيمية تحت تأثير فعل وراثى محدد يقودها إلى تكوين عضو جديد. لكن ولسبب غير معروف حتى الآن يتم نشوء الخلايا الميرستيمية فى زراعة الأنسجة من عدد قليل نسبياً من الخلايا المنزرعة .

طرق الحصول على نباتات من مزارع الأنسجة

يمكن باستخدام الأنواع المختلفة من المزارع السابق ذكرها فى بداية هذا الباب الحصول على نباتات كاملة أو أفرع يتم دفعها للتجذير فى مرحلة لاحقة. حيث يتم استحثاث مجموعة من الخلايا فى المُستأصَل النباتى للتكشف والتطور إلى نبات كامل. وفى بعض الحالات تدخل البراعم العرضية التى تم تكشفها فى الانقسام ويتوالى تطور براعم جديدة والعديد من النباتات. ويتم نشوء النباتات فى مزراع الأنسجة إما مباشرة direct regeneration من المُستأصَل النباتى دون المرور بمرحلة الكالس أو غير مباشر indirect regeneration بعد تكوين الكالس. ففى الطريقة المباشرة يتم دفع البراعم المتكونة سابقاً على النبات الأم أو تلك التى تكونت على النسيج عقب الزراعة

دون تكوين كالوس للنمو وتكوين أعضاء جديدة (شكل رقم١-٣) أو أجنة جسدية. وتعد الطريقة المباشرة أكثر حفاظاً على ثبات التركيب الوراثى فى الأفراد الناتجة. أما الطريقة غير المباشرة فيتم تكوين الأجنة الجسدية أو الأعضاء سواء الأشطاء أو الجذور بعد تكوين الكالس والذى يلاحظ غالباً عقب زراعة المُستأصَل النباتى فى وسط يحتوى على تركيز مرتفع من الأوكسينات. أى يتم التكشف من براعم عرضية لم تكن موجودة على النبات الأم، وهذه الطريقة تساعد على حدوث تباين وراثى بين الأفراد الناتجة والأم. ويعتبر حدوث تباين وراثى فى الأفراد الناتجة أحد عيوب أو مميزات الطريقة المتبعة للإكثار على أساس الغرض من زراعة الأنسجة. لكن من الناحية العملية وحتى فى حالة إتباع الطرق التى تستخدم للمحاولة دون تكوين براعم عرضية فإن زراعة الأنسجة لا تضمن حدوث تكشف الأشطاء بالطريقة المباشرة فقط حيث يتم تكوين بعض البراعم العرضية وقد يصعب التمييز بين النباتات الناتجة من التكشف المباشر وغير المباشر.

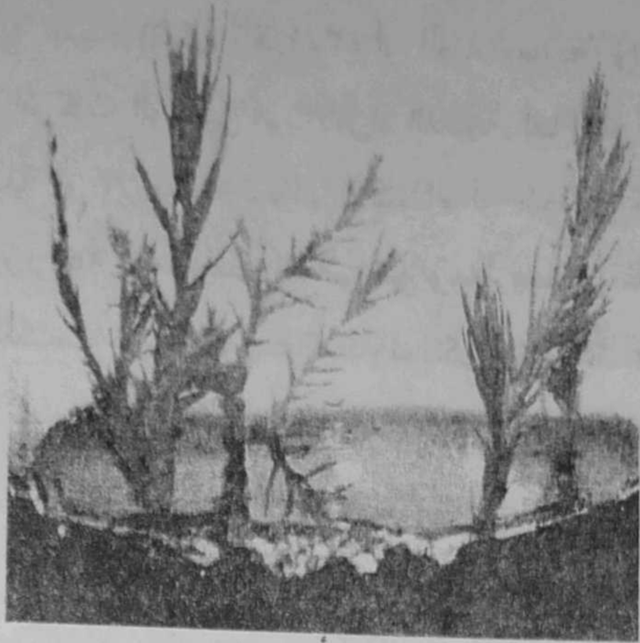
أهميه زراعة الأنسجة

بعد التطور الكبير لعلم زراعة الأنسجة خلال القرن الماضى أصبح له الكثير من الفوائد سواء من الناحية الأكاديمية أو التطبيقية (Baran & Biswajit, 2005) ومنها:

١. دراسة عمليات التكشف والتطور وكذلك الأيض.
٢. دراسة تأثير الهرمونات والتداخل بين أنواعها المختلفة على الخلايا.
٣. دراسة دورة الخلية والتركيب الخلوى.
٤. استحداث الطفرات.
٥. دراسة العلاقة بين المسببات المرضية والنبات على المستوى الخلوى والنسيجى والنبات الكامل.
٦. تعتبر طريقة ناجحة وسريعة واقتصادية لإكثار عديد من النباتات الاقتصادية، ويعتبر هذا من أكثر المجالات تطبيقاً.
٧. مصدر بديل عن الزراعة للحصول على المواد الطبية النباتية معملياً بل أمكن استخدام النباتات كالدخان والموز والبطاطس فى إنتاج بعض الأمصال.



ب



أ



جـ

شكل ١-٣: نمو البراعم الأبطية الموجودة علـى المُستأصَـل النبـاتى لتعطـى نباتـات مطابقـة للنبـات الأم فـى نبـات *Junipѕrus communis*(أ)، وتكشـف البـراعم العرضـية مباشرة دون تكوين الكالس فى نباتات *Ruta graveolens*(ب)، وخلـيط مـن التكشـف المباشر وغير المباشر فى نفس النبات (جـ).

٨. زراعة الأنسجة هى النواة الأساسية لتجارب الهندسة الوراثية ونقل الجينات. فالهندسة الوراثية تقوم بتحوير الخلايا بإدخال الجين المستهدف إليها، لكن لا بد من زراعة الخلية فى معلق خلوى أو دفع تلك الخلية لتكوين نبات ليعبر به الجين المستهدف عن نفسه وهذا هو دور زراعة الأنسجة.

٩. إنتاج نباتات خالية من الأمراض خاصة الأمراض الفيروسية.

١٠. نقل الأصول الوراثية والنباتات من مكان إلى آخر بسهوله وتجنب نقل المسببات المرضية المصاحبة لها.

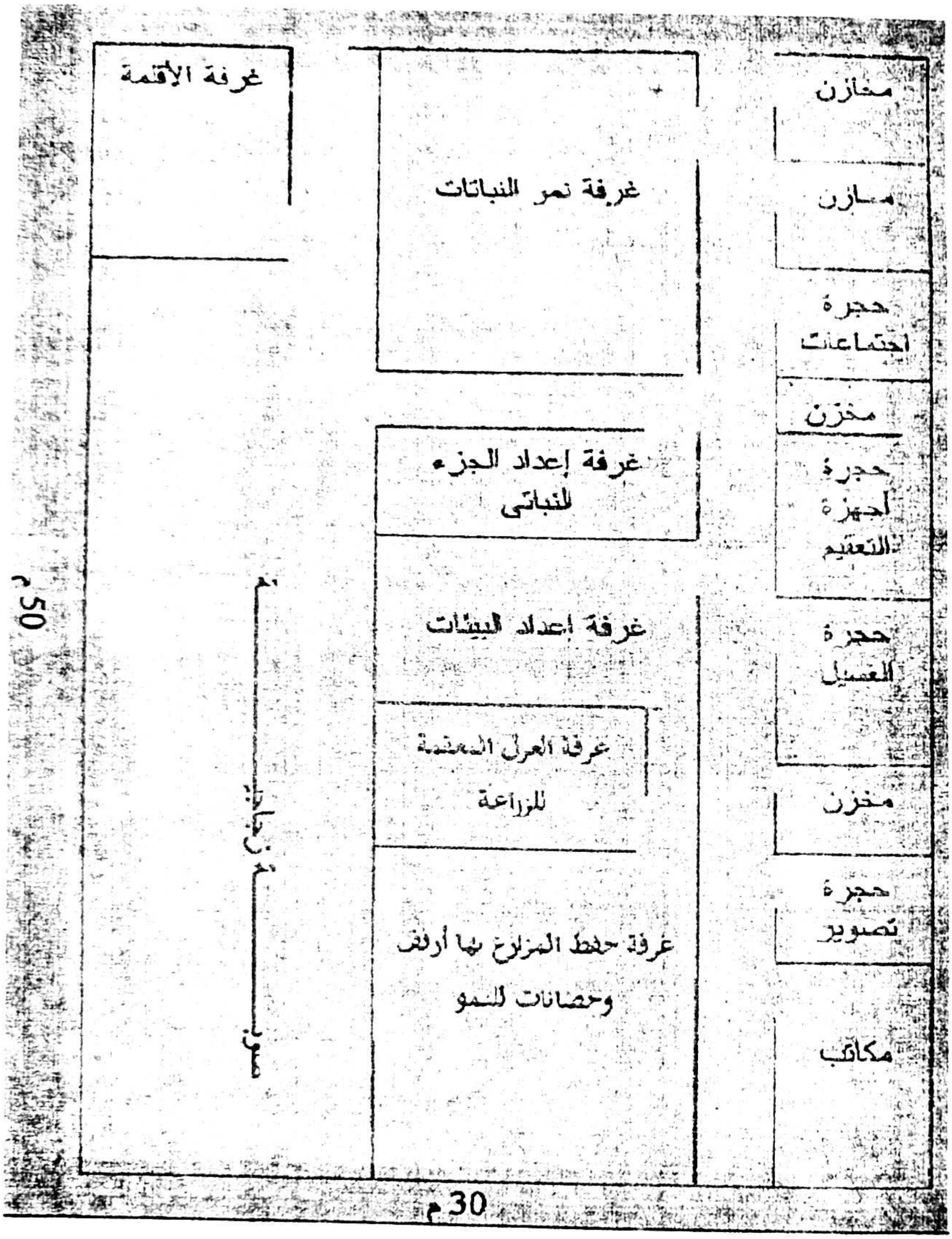
١١. استخدامها فى تربية النبات فى المجالات الآتية:

- إجراء بعض التهجينات التى يصعب إجرائها بالطرق التقليدية أو على الأقل المساعدة فى إنجاحها.
- حفظ الأصول الوراثية وقد أمكن التغلب على الكثير من المعوقات التى واجهت البنوك الوراثية.
- إحداث تباين وراثى فى العشيرة والانتخاب داخلها وخاصة فى النباتات خضرية التكاثر كمعظم نباتات الفاكهة والزينة وبعض المحاصيل الأخرى. ويعتبر احداث التباين من الخطوات الأساسية فى برامج التربية.
- إنتاج نباتات أحادية العدد الكروموسومى ومضاعفتها لإنتاج سلالات نقية تستعمل فى برامج التربية المختلفة خاصة فى المحاصيل خلطية التلقيح.
- تقصير الفترة الزمنية التى يستغرقها برنامج التربية حيث يمكن اختصار عدة سنوات من برامج التربية.

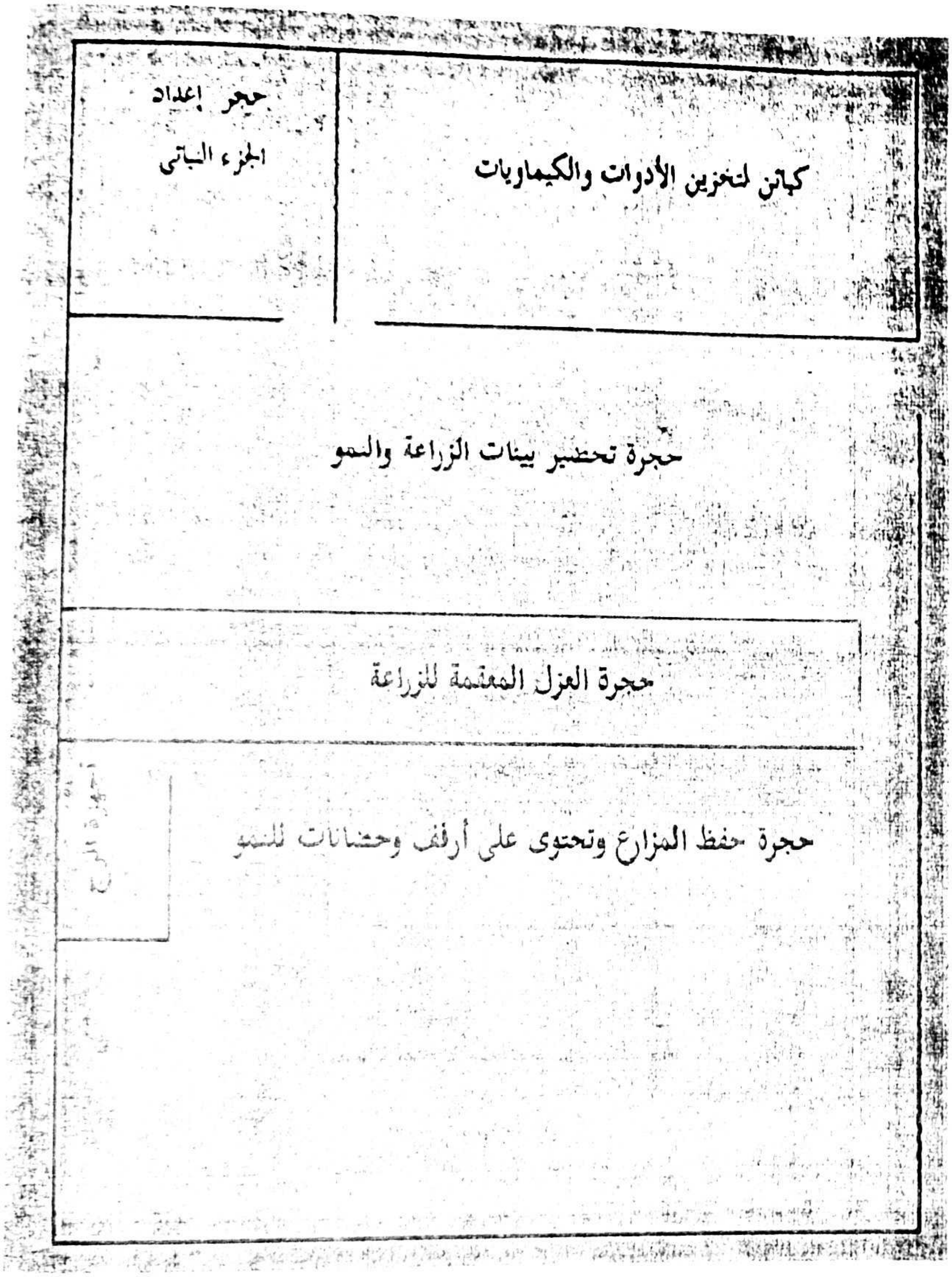
مختبر زراعة الأنسجة

تختلف مساحة وتجهيزات معمل زراعة الأنسجة طبقاً للغرض من إنشاء المعمل، فعلى سبيل المثال المشاتل التجارية يمكنها أن تخصص حجرة أو أكثر بهدف الإكثار الدقيق لبعض النباتات. بينما يكون المعمل أكثر ترتيباً وتجهيزاً وأكبر فى المساحة فى الشركات المتخصصة فى الإنتاج التجارى. ويتضح من هذا عدم وجود تصميم معين وتجهيزات خاصة لمعمل زراعة الأنسجة. لكن يجب توفير بعض الشروط الأساسية فى المبنى والتجهيزات التى لا يمكن الاستغناء عنها. وأول ما يجب مراعاته عند إنشاء المعمل هو أن يكون فى مكان بعيد عن مصادر التلوث الميكروبى والكيماوى كأدخنة وأبخرة المصانع ومناطق هبوب الرياح. ويراعى أن تكون الأبواب والشبابيك محكمه الغلق ولا تسمح بتسرب الأتربة أو دخول الحشرات والقوارض وما شابه ذلك. كما يجب أن تكون الأرضيات والجدران من مواد ملساء سهلة التنظيف.

أما عن المساحة والتقسيم الداخلى للمعمل فكما تقدم ليس هناك تصميم ملزم لكن يجب بقدر الإمكان توفير حجرة إعداد البينات، وأخرى منعزلة عنها وغير معرضة للتلوث وتسمى بغرفة الزراعة culture room وبها يتم فصل الجزء النباتى وزراعته فى البيئة المعدة لذلك. وتحتوى هذه الغرفة على وحدات العزل ذات الهواء المعقم المعروفة بالـ laminar air flow hood لعزل المُستأصَل النباتى وزراعته. ونظراً لأن الجزء الأكبر والأهم من زراعة الأنسجة يتم فى هذه الغرفة فيجب أن يتم التحكم فى درجة حرارتها وتوفير مصدر للأشعة فوق البنفسجية لتعقيم جو الحجرة. ثم غرفه أخرى وتسمى بغرفة النمو growth room ويتم التحكم فى درجة حرارتها وساعات الإضاءة وكذلك شدة الإضاءة بغرض تحضين المزرعة. ويتحتم التسجيل الجيد للنتائج وجود آلة تصوير رقمية ذات جودة عالية، وللحصول على صور جيدة يتم استعمال ذلك الصندوق المضئ الذى يستعمله الأطباء لفحص صور أشعة أكس. ويوضع هذا الصندوق خلف أوعية الزراعة، وإن كانت المزرعة فى أطباق بترى ويراد تصوير النبيتات فيتم وضع مصدر الإضاءة اسفلها. ويلحق بالمعمل صوبه لتنمية النباتات المستعملة وأقلمة النباتات الناتجة. ويراعى بقدر الإمكان عدم دخول الأفراد غير المعنيين بالعمل إلى المعمل للحد من التلوث. ويفضل وجود غرفة خارجية أمام المعمل يتم دخول المعمل. أما من حيث التجهيزات فإن هناك بعض الأجهزة الضرورية التى يجب توافرها بجانب التجهيزات المعملية العادية كأجهزة تقطير المياه وأجهزة قياس الوزن المختلفة، الثلاجات، المجمدات، جهاز التعقيم الرطب (الاوتوكلاف)، فرن للتعقيم، مقلب مغناطيسى، جهاز قياس الرقم الهيدروجينى ويلحق بالمعمل غرفة أخرى لغسيل الأدوات المستعملة. ويوضح الشكلين رقم (١-٤ و١-٥) تصميمين مختلفين لمعامل زراعة الأنسجة.



شكل ١-٤: رسم تخطيطى لمعمل زراعة الأنسجة ولم تحدد الأبعاد على الرسم لكون ذلك يتوقف على المساحة المتاحة لكن تراعى نسبة الأجزاء لبعضها البعض.



شكل ١-٥: رسم تخطيطى لمعمل زراعة الأنسجة ولم تحدد الأبعاد على الرسم لكون ذلك يتوقف على المساحة المتاحة لكن تراعى نسبة الأجزاء لبعضها البعض.

الفصل الثانى

بيئات النمو المستعملة فى زراعة الأنسجة

من المعروف فى تغذية النبات أن هناك مجموعة من العناصر الغذائية اللازمة لنمو النباتات بصفة عامة يطلق عليها العناصر الأساسية أو الضرورية essential elements وقد تدخل تلك العناصر فى تركيب النبات مثل النتروجين والكربون والأكسجين، وبعضها لا يدخل فى تركيب الخلايا كالبوتاسيوم لكنه يؤثر على النمو. كما يعتبر بعضاً منها كالحديد والمنجنيز والمولبدنيوم عوامل مساعدة فى العديد من التفاعلات الكيمائية. وتقسم العناصر الأساسية وهى أربعة عشر - بصرف النظر عن الكربون والهيدروجين والأكسجين- على حسب الكمية التى يحتاجها النبات إلى مجموعتين هما العناصر الكبرى macroelements وتشمل النتروجين، والفوسفور، والكالسيوم، والبوتاسيوم، والماغنسيوم، والكبريت والقسم الآخر يضم العناصر الصغرى microelements وهى الحديد، والمنجنيز، والزنك، والكلوريد، والصوديوم والبورن، والنحاس، والمولبدنيوم. وقد أضاف Witte *et al.* (2002) النيكل إلى العناصر الصغرى فى مزارع الأنسجة حيث شجع من نمو البطاطس وفول الصويا معملياً لدوره البارز فى أيض النتروجين. ويعتقد أن عدم حدوث تسمم باليوريا على الرغم من عدم اضافة النيكل إلى البيئة فيرجع إلى إحتواء الآجار المستعمل فى تصلب البيئة على شوائب من النيكل. وأمكن لعلماء تغذية النبات تحديد تلك العناصر باستخدام نظم الزراعة بدون تربة. والجدير بالذكر أن هناك تشابه كبير فى الأسس المتبعة لتحديد مكونات بيئة مزارع الأنسجة من العناصر المعدنية وتحضير المحاليل المغذية للنباتات فى البيوت المحمية. وبصفة عامة هناك عدة شروط يجب توافرها فى العنصر حتى يصبح من العناصر المغذية وهى:

١. يؤدى غياب هذا العنصر من وسط النمو إلى عدم قدرة النبات على إتمام دورة حياته الطبيعية.
٢. يسبب نقص العنصر من وسط النمو أعراض مرضية لا تزول إلا بإضافة هذا العنصر ولا يمكن لعنصر آخر أن يحل محله.
٣. يدخل العنصر فى تركيب أو تخليق جزئ اساسى للنمو.
٤. يدخل هذا العنصر مباشرة فى عمليات الأيض النباتى.

وأصبح من الثابت فى علم زراعة الأنسجة أهمية تلك العناصر الضرورية لنمو النباتات فى الطبيعة وكذلك نمو النباتات والأعضاء فى مزارع الأنسجة. وكان التأخر فى التوصل إلى وسط غذائى مناسب لنمو مزارع الأنسجة حجر عثرة فى سبيل تقدمها لفترة طويلة جداً (Vasil, 2008). وقد أشار Ramage & Williams (2002) إلى دور العناصر المعدنية فى تنظيم عملية التكشف فى مزارع الأنسجة. ويتوقف نجاح زراعة الأنسجة فى تحقيق هدف محدد على مدى توفر تلك العناصر بصورة ميسرة للامتصاص فى الوسط المغذى. وقد اعتمدت الأبحاث التى حددت التركيب الأمثل للبيئات المستعملة فى مزارع الأنسجة على تحليل النباتات وتقدير نسب العناصر المختلفة فى أنسجتها. ويرى Gislerod *et al.* (2005) أنه ربما يساعد تحليل أنسجة نبات ما فى تحديد التركيز الأمثل من العناصر المختلفة التى تحفز نموه فى مزارع الأنسجة، والجدير بالذكر أن هذه كانت الاستراتيجية التى اتبعها Murashige and Skoog (1962) فى تحضير البيئة المشهورة لهما وهو نفس التوجة الحديث الذى يشير إليه Bouman & Tiekstra (2005).

وبالإضافة إلى تلك العناصر الأساسية فإن زراعة الأنسجة تتطلب إضافة الكربوهيدرات فى صورة سكر القصب غالباً كمصدر للطاقة الضرورية لعمليات النمو والتكشف، وذلك لأن الأنسجة المنزرعة وكذلك النباتات المستنسخة منها ليست لها القدرة غالباً على القيام بعملية البناء الضوئى لانخفاض الكثافة الضوئية، أو لأن

المزرعة قد تكون محفوظة فى الظلام. ويمكن تحت ظروف محددة (Zobayed, 2005) خفض تركيز الكربوهيدرات أوالاستغناء عنها تماماً فيما يعرف بالمزارع خليطة التغذية mixophotoautotrophic أو ذاتية التغذية autophototrophic وهناك بعض الأحماض العضوية والأمينية والفيتامينات والهرمونات التى تضاف للبيئة لاهميتها فى النمو والتكشف. وأهتم العديد من العلماء بعمل عدة توليفات مختلفة من العناصر الغذائية المكونة للبيئة لتتلائم مع نوع النسيج المنزرع والغرض من زراعته. وقبل أن نتعرض لذلك بشىء من التفصيل يجب أن نعرض بعض المصطلحات والمفاهيم الكيمائية الهامة فى هذا الصدد:

العنصر Element: هو المادة التى لا يمكن أن تقسم إلى مواد أخرى بالطرق الكيمائية العادية مثل الكربون والنحاس وغيرها.

الذرة Atom: هى أصغر جزء من المادة يحتفظ بخواص العنصر، وتوجد الذرة فى الحالة الحرة فى صورة جزئ فى بعض الحالات يكون الجزئ بسيط مثل النتروجين والفسفور والبوتاسيوم أو مكون من ذرتين مثل الهيدروجين والأكسجين ويوضح عدد الذرات برقم صغير أسفل الرمز الكيمائى مثل H_2 و O_2 .

المركب Compound: يتكون من اثنين أو أكثر من العناصر التى اتحدت كيميائيا بنسبة ثابتة مثل $C_{12}H_{22}O_{11}$ و H_2O و HCl .

الجزئ Molecule: أصغر جزء من المركب يمكن أن يوجد على إنفراد مع احتفاظه بخواص المركب.

الأيون Ion: ذرة أو مجموعة من الذرات لها شحنة كهربائية سالبة أو موجبة، على سبيل المثال يتأين مركب NaCl عند إذابته فى الماء لانخفاض التجاذب بين الأيونات إلى أيون صوديوم Na^+ له شحنة موجبة ويسمى كاتيون cation وأيون كلور Cl^- سالب الشحنة ويسمى أنيون anion. وينتج الأيون الموجب عندما يفقد الجزئ أو الذرة

المتعادلة إلكترون أو أكثر، أما الأيون السالب فينتج عندما يكتسب الجزئ أو الذرة المتعادلة الكترون أو أكثر. وينتج عن الاتحاد بين أيون موجب وآخر سالب تكوين حامض أو قاعدة أو ملح. أما عدد الشحنات الكهربائية على الأيون فيعرف بالتكافؤ. وتتفاعل الأيونات مع بعضها البعض على أساس تكافؤها فمثلاً يشترك كاتيون أحادى التكافؤ كالصوديوم Na^+ مع أنيون واحد سالب من الكلور Cl^- ليعطى NaCl أما كاتيون الكالسيوم الثنائى Ca^{2+} فيتحد مع أنيونين من الكلور Cl^- ليعطى $CaCl_2$.

الملح Salt: هو المركب الذى يتأين عند ذوبانه فى الماء ويعطى أيونات غير أيونات الهيدروجين H^+ أو الهيدروكسيل OH^-.

الوزن الجزيئي Molecular weight: وهو يشير إلى مجموع الأوزان الجزيئية لذرات العناصر التى يتركب منها المركب معبراً عنها بالجرام. على سبيل المثال تتركب نترات البوتاسيوم KNO_3 من ذرة بوتاسيوم وذرة نتروجين وثلاث ذرات أكسجين، وحيث أن الوزن الجزئى لتلك الذرات هو K= 39.102 و N =14.0067 و O = 15.9994 فإن وزنها الجزئى هو ١ × ٣٩.١٠٢+ ١ × ١٤.٠٠٦٧ + ٣ × ١٥.٩٩٩٤

المولريتى Molarity: يحضر محلول تركيزه مولر واحد من المادة بإذابة الوزن الجزيئى للمادة معبراً عنه بالجرام فى لتر من المذيب أى أن المولرتى هى عدد المولات من المركب المذابة فى لتر من المذيب ويرمز لها بالرمز M. ومن الأفضل أن تستخدم وحدات molarity وليس الجرام/لتر فى تحضير بيئات مزارع الأنسجة حيث يحتوى المول من أى مادة على عدد ثابت من الجزيئات وهو ٦.٠٢٣ × ١٠^٢٣ وهو ما يعرف برقم Avogado. ومن ثم يمكن مقارنة النشاط البيولوجى للمركبات على أساس عدد المولات. وإذا كان المركب موجوداً فى صورة ملح فإن عيارية الأيونات الداخلة فى تركيبه يمكن أن تحسب بضرب عياريته فى الجزيئات المختلفة.وعلى هذا فإن : ٢٠

مليمول من $CuSO_4$ تحتوى على ٢٠ مليمول من Cu^{2+} و ٢٠ مليمول من $(SO_4)^{2-}$.

أما ١٠ مليمول من $(NH_4)_2\ SO_4^{2-}$ فتحتوى على ١٠ مليمول من NH_4^+ و ١٠ مليمول من SO_4^{2-} . ويلاحظ أن نفس عدد أيونات النحاس Cu^{2+} يوجد فى ٢٠ مليمول من $CuSO_4$ أو $CuSO_4.5H_2O$ وعلى ذلك يكون تعبير ٢٠ مليمول من $Cu\ SO_4$ أفضل لأن العنصر قد يكون متوفراً فى صورة الملح المائى أو غير المائى. وبذلك يمكن حساب الكمية اللازمة من أى الملحين لتعطى كمية النحاس المطلوبة. لكن بأن يقال أن ١٩ ملجم/لتر من $CuSO_4$ أضيفت إلى البيئة فإن القارئ قد يسأل هل هى ٢٦ مليمول $CuSO_4.5H_2O$ أم ١٢.٨ مليمول $Cu\ SO_4$. ولكن من عيوب استخدام وحدات العياريه فى تحضير البيئات ضرورة حساب عدد الجرامات التى يجب إضافتها للحصول على نفس التركيز. لكن كما سبق فهى أكثر دقه فى المقارنة بين التركيزات المختلفة من المركبات. ويمكن ضرب المثال التالى للتوضيح إذا أعطى ٣ ملجم/لتر من منظم النمو 2,4-D نفس الكالس المتكون عند استعمال ٢.٥ ملجم/لتر IAA فأيهما أكثر تأثيراً؟ علماً بأن الوزن الجزيئى لهذين المركبين هو ٢٢١.٠٤ و ١٧٥.١٩ على التوالى. نلاحظ أن عدد الجزيئات الموجودة من كلا المركبين هو 2,4-D= 221/3= 13.6 mM أما IAA=175.19/2.5 = 14.2 mM. أى أن 2,4-D أكثر تأثيراً حيث أن عدد أقل من الجزيئات أعطى تأثيراً مساوياً لعدد أعلى من جزيئيات IAA. ولذا تشترط بعض المراجع العلمية عدم استخدام وحدات الوزن عند الإشارة إلى التركيزات المستعملة من المواد الكيميائية المختلفة.

ملحوظة:

1g = 1000 mg   mg = 1000 µg 10^{-6} = 1.0 mg/l = 1 ppm

10^{-9} = 0.001 mg/l =1µg 10^{-7} = 0.1 mg/l

mM = MW in　　1 µM =MW in µg/l = 10^{-6} M =10^{-3} mM

mg/L =10^{-3} M

وفيما يلى عرض مفصل لمكونات بيئات النمو المستعملة فى زراعة الأنسجة.

أولاً: المكونات غير العضوية Non organic components

يمتص النبات الكامل وكذلك الأنسجة والخلايا فى مزارع الأنسجة العناصر الغذائية فى صورة أيونات، وعادة يتم إضافة العناصر المغذية فى صورة أملاح حيث تتأين فى البيئة. ويتم امتصاص بعض العناصر فى مزارع الأنسجة فى صورة كاتيونات مثل Ca^{2+} و K^{+} و Mg^{2+} وبعضها فى صورة أنيونات مثل Cl^{-} و SO_4^{-} و $H_2PO_4^{-}$ أما النتروجين فيمتص فى صورة كاتيون الأمونيا NH_4^{+} أو أنيون النترات NO_3. وتعتبر عملية اختيار التركيز الأنسب من الأيونات المختلفة وكذلك الاتزان الأيونى بين الأيونات وبعضها البعض، بالإضافة إلى التركيز الكلى للأيونات فى البيئة من أهم العوامل المؤثرة فى نجاح زراعة الأنسجة. هذا مع الأخذ بعين الاعتبار الرقم الهيدروجينى للبيئة فهو المحدد الأساسى لتيسير العناصر. ولما كانت الخلايا النباتية فى مزارع الأنسجة على العكس من النباتات فى المزارع المائية تتحمل تركيزات عالية نسبياً من Na^{+} و Cl^{-} دون ضرر فإن هذه الأيونات لا تعطى أهمية كبيرة عند تحضير البيئة ومن ثم تعتبر الأملاح المحتوية على الصوديوم والكلور مصدراً للعناصر الأخرى. لكن قد يؤدى خفض تركيز الكلور مع زيادة الفوسفور والماغنيسيوم إلى تحسين النمو واستمراره لفترة اطول دون الحاجة إلى تجديد البيئة المغذية (Gislerod *et al.*, 2005)

يحصل النبات على العناصر الغذائية عن طريق الانتقال الحر والذى يعرف بالبسيط دون الحاجة إلى طاقة، أو بعملية الانتقال النشط التى تحتاج إلى طاقة. وقد أوضح Willams (1993) أن امتصاص العناصر من البيئة يتناسب مع تركيزها حتى

الضعف، لكن قد يختلف الأمر مع بعض العناصر فزيادة تركيز الزنك فى البيئة لا يترتب عليها زيادة امتصاصه ، بمعنى أن للعنصر تركيز أمثل فى النسيج لا يزيد عنه (Leifert *et al.*, 1995). والامتصاص النشط لا يرتبط فى غالب الأمر بتركيز الأيون عكس الامتصاص غير النشط الذى يتأثر بتركيز الأيون ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجينى، بالإضافة إلى الحالة الفسيولوجية والبيوكيميائية للنسيج. ويجب الإشارة إلى أن ثغور النباتات فى مزارع الأنسجة تكون مفتوحة مما يؤهلها لإمتصاص المكونات المختلفة للبيئة (De Klerk & Wijnhoven, 2005)، على الرغم من تشبع الفراغ المحيط بالنباتات فى مزارع الأنسجة بالرطوبة. أى أن امتصاص الماء والعناصر من البيئة لا يخضع لنقص الرطوبة فى الفراغ المحيط بالنبات كما هو الحال فى الظروف الطبيعية حيث تتمتع النباتات فى مزارع الأنسجة بقدرة عالية على تدفق الماء عبر انسجتها لأن الثغور تكون مفتوحة غالباً (Beruto *et al.*, 1999). وفيما يلى عرض موجز للعناصر المغذية الكبرى من حيث نوعها وأهميتها والصورة التى تضاف عليها والتركيز الشائع منها فى بيئات مزارع الأنسجة وقد ناقش كلاً من (Pierik, 1987) و (Leifert *et al.*, 1995) و Bouman & Tiekstra (2005) و (George & De Klerk, 2008) ذلك باستفاضة.

أ. العناصر المغذية الكبرى Microelements

١. النيتروجين

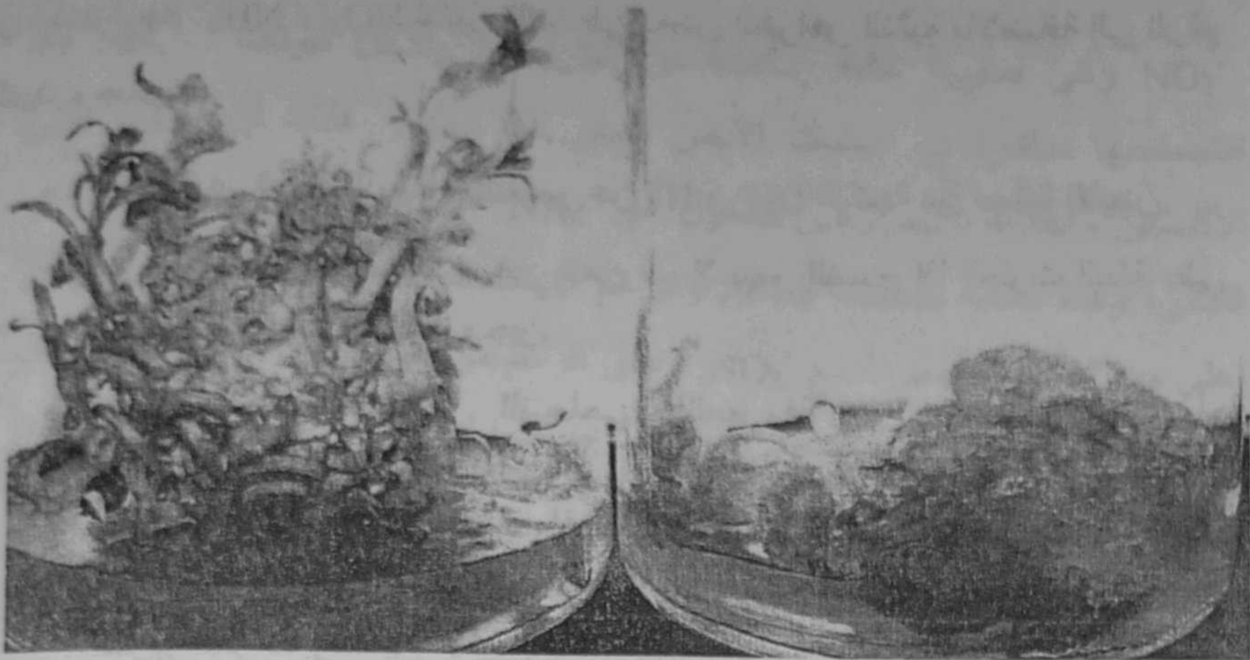
يدخل النتروجين فى تكوين العديد من المركبات العضوية كالبروتين، والأحماض النووية، والبروتوبلازم، والقلويدات. وتظهر أعراض نقصه على صورة اصفرار النبات وتقزم النمو. وتتراوح نسبة النتروجين فى النباتات المختلفة من ١.٥-٤% من الوزن الجاف. ويتأثر النمو والتكشف فى مزارع الأنسجة بدرجة كبيرة على مدى تيسر النتروجين والصورة الموجودة منه. وتمتاز الأنسجة المنزرعة بقدرتها على امتصاص النتروجين إما فى صورة آمونيا NH_4^+ وهى صورة مختزلة أو نترات

وتدخل أيونات NH_4^+ بعد النتروجين وهى صورة عالية الأكسدة من النتروجين NO_3^- فلابد أن تختزل بنزع امتصاصها مباشرة فى عمليات الأيض النباتى أما NO_3^- الأكسجين وإحلاله بالهيدروجين فتتحول إلى NH_4^+ قبل دخولها فى عمليات الأيض النباتى، وهذه عملية مستهلكة للطاقة. ومن ثم فإن معظم النباتات تحتوى على تركيز أعلى من NH_4^+ بالمقارنة مع NO_3^-. وعلى الرغم من ضرورة اختزال NO_3^- قبل دخولها فى عمليات الأيض النباتى فإنه يجب إضافتها لبيئة مزارع الأنسجة بل تحتوى أغلب البيئات على تركيز عالى من النترات بالمقارنة مع الأمونيا، وذلك للمحافظة على الرقم الهيدروجينى للبيئة والذى يتم ضبطه عند إعداد البيئة ليكون ٥.٥-٥.٨ لتجنب التأثير السام لأيونات NH_4^+ فى البيئة.

تمتص الأمونيا من البيئة فى الوسط القلوى ويصاحب ذلك خروج أيونات الهيدروجين للبيئة فينخفض الرقم الهيدروجينى إلى ٤.٢-٤.٦ وعند ذلك يثبط امتصاص الأمونيا ويحفز امتصاص النترات والذى يصاحبه خروج أيونات الهيدروكسيل للبيئة مما يرفع الرقم الهيدروجينى للبيئة ويشجع امتصاص الأمونيا مرة أخرى. وبذلك يحدث اتزان فى الرقم الهيدروجينى للبيئة بدون وجود محلول منظم للرقم الهيدروجينى. ولثبات الرقم الهيدروجينى أهمية كبرى ليس فقط لدوره فى امتصاص العناصر المختلفة بل للعوامل الأخرى التى سوف توضح لاحقاً. وقد وجد أن استهلاك مليمول واحد من الأمونيا فى تكوين مادة عضويه يصاحبه خروج حوالى ٠.٨-١.٠ بروتون من الهيدروجين إلى البيئة، ولكل استهلاك مكافئ من النترات يخرج ١-١.٢ من بروتون الهيدروكسيل إلى البيئة. وبذلك إذا كانت نسبة النترات فى البيئة ضعف الأمونيا لا يحدث تغير فى الرقم الهيدروجينى للبيئة، لكن لا بد أن يؤخذ فى الاعتبار ارتباط الامتصاص بالنوع النباتى. وهناك بعض الأبحاث التى أشارت إلى إمكانية استعمال المحلول المنظم المكون من $Na_2HPO_4 + KH_2PO_4$. ومن الضرورى عند إعداد البيئة

أن تحدد نسبة NO_3^- / NH_4^+ لتأثير ذلك على بعض الظواهر التالية بالإضافة إلى الرقم الهيدروجينى:

- حفظ اتزان شحنة النسيج والتخلص من H^+ و OH^- الناتجة من عملية الأيض.
- فى بعض الحالات ولسبب غير معروف لا ينمو النسيج إذا احتوت البيئة على NO_3^- كمصدر وحيد للنتروجين.
- لوحظت ظاهرة التميؤ الزجاجى والمعروفة بـ hyperhydrisity أو vitrification أو glassiness فى الأفرع النامية فى بيئة بها الأمونيا مصدر وحيد للنتروجين. حيث يسبب ارتفاع تركيز الأمونيا زيادة فى معدل التخليق الحيوى للبروتين والأحماض الأمينية وزيادة فى معدل استهلاك الكربوهيدرات.وتصبح الأفرع (كما فى الشكل رقم ٢-١) مكتنزة بالماء ورخوة ولها مظهر زجاجى وسهلة الكسر.وغالباً تفقد تلك الأفرع القدرة على النمو الطبيعى والتضاعف والأقلمة، وبذلك لا يمكن استعمالها فى الإكثار مرة أخرى. وقد اختفت هذه الظاهرة فى مزارع أنسجة بعض النباتات عندما أضيفت النترات للبيئة. وعلى العموم تتضح أعراض نقص النتروجين على النسيج باستعمال الأمونيا أو النترات كمصدر وحيد للنتروجين دون وجود محلول منظم للرقم الهيدروجينى من بعض الأحماض العضوية ثلاثية الكربوكسيل كالسكسنك.
- كما سبق القول يعتبر وجود أيونات الأمونيا والنترات أحد العوامل الأساسية التى تحافظ على ثبات الرقم الهيدروجينى للبيئة حيث يعمل كلا منهما على توفير الظروف المناسبة لامتصاص الأخر. وقد وجد Avila *et al.* (1998) أن الرقم الهيدروجينى لبيئة (MS) ;(1962) Murashige & Skoog ينخفض بمعدل ٠.٧ وحدة بعد ١٥ يوم من زراعة أفرع البطاطس إذا كانت البيئة تحتوى على الأمونيا كمصدر وحيد للنتروجين.
- لاحظ Arnozis *et al.* (1988) إحتواء النباتات النامية فى بيئة بها الأمونيا كمصدروحيد للنتروجين على نسبة مرتفعة وغير عادية من إنزيم phosphoenolpyruvate (PEP) الضرورى فى عملية تثبيت ثانى أكسيد الكربون اثناء البناء الضوئى. لكن على الرغم من ذلك ثبط معدل تخليق الكلوروفيل والبناء الضوئى تحت هذه الظروف.



شكل ٢-١: فى اليسار الأفرع العادية لنباتات القرنفل *Dianthus caryphylus* النامية فى مزارع الأنسجة وأفرع بها ظاهرة التميؤ الزجاجي فى اليمين .

وسجلت الكثير من الدراسات أهمية النتروجين الكلى بالبيئة علاوة على صورته فى عمليات نمو الخلايا وتكشفها وتحويل النتروجين إلى الصورة العضوية. فوفرة النتروجين فى صورة ميسرة ضرورية للحصول على نمو معلق الخلايا فى صورة غير متكشفة، بينما يؤدى انخفاض تركيز النتروجين إلى زيادة معدل أيض بعض المركبات الخالية منه مثل اللجنين المصاحب لعمليه التكشف. وبصورة عامة يمكن القول أن الأنسجة يمكنها النمو فى بيئة تحتوى على الأمونيا فقط بإضافة محلول منظم للرقم الهيدروجينى لوسط النمو، حيث أن وفرة الأمونيا تزيد من معدل تكوين البروتين والأحماض الأمينية مع استهلاك أقل للطاقة من المواد الكربوهيدراتية. ويبدو أن هذا التغير فى الأيض الطبيعى يسبب ظاهرة التميؤ الزجاجى. لكن يبدو أن الأمونيا لها دوراً فى تنظيم عمليه انقسام الخلايا وتكون الجدر الخلوية بالإضافة إلى تأثيرها على نشاط منظمات النمو فى المزرعة. ولوحظ تكشف أشطاء من كالوس نباتات Brassica عندما كان التركيز الكلى للنتروجين ٣٥-٤٥ مليمول وقل عدد

الأشطاء بارتفاع أو انخفاض التركيز عن ذلك. كما سجل Gertsson (1988) زيادة فى عدد الأشطاء المتكشفة من زراعة عنق أوراق نباتات *Senecio hybridus* بزيادة تركيز النتروجين فى بيئة MS إلى ٧٥ مليمول بينما انخفض العدد عند تركيز ٣٠ مليمول مع ثبات نسبة الأمونيا إلى النترات.

نسبة NH_4^+/NO_3^- فى البيئة

يعتبر أيون النترات مصدر هام للنتروجين فى بيئات مزارع الأنسجة، وتحتوى أغلب البيئات على نسبة كبيرة من النتروجين فى هذه الصورة والتى تعتبر غير سامة على العكس من الأمونيا التى تزيد من تخليق هرمون الإثيلين فى أنسجة النبات فقد سجل Ogura-Tsujita and Okubo (2006) انخفاضاً يقدر بـ ٣٠-٥٥% فى معدل تخليق الإثيلين للمستأصلات النباتية لنبات *Cymbidium kanran* بعد ١-٣ شهور من الزراعة عند استعمال بيئة MS فقيرة فى النتروجين. وعند محاولة حساب التركيز الأمثل من الأمونيا والنترات فى البيئة المستخدمة لزراعة أنسجة نبات ما لابد أن يؤخذ فى الاعتبار التركيز الكلى للنتروجين بالإضافة إلى نسبة NH_4^+/ NO_3^- ، فمثلا بيئة MS تحتوى على نسبة عالية من أيون النترات مقارناً مع الأمونيا (٦٦:٣٤). كذلك يلاحظ أن التركيز الكلى للنتروجين بهذه البيئة أعلى من معظم البيئات الأخرى. وفى معظم البيئات المستعملة لزراعة البقوليات ينصح بزيادة هذه النسبة أى تركيز النترات إلى الأمونيا. وفى بعض المزارع يتم تعديل التركيز الكلى للنتروجين فى البيئة المستعملة بغرض تحسن النمو. وقد أوضح George & De-klerk (2008) أن لهذه النسبة أهمية فى آلية فعل منظمات النمو لكن تظل هذه الآلية غير معروفة بصورة تامة. فعلى سبيل المثال تحتاج الخلايا إلى تركيز منخفض من السيتوكينين للإنقسام عندما يكون تركيز النتروجين المختزل مرتفع نسبياً. ويحتاج بروتوبلاست خلايا الدخان إلى تركيز ٠.٥-٢ ملجم/لتر من BA إذا كانت البيئة تحتوى النترات فقط. وعند إضافة

الأمونيا أو حامض الجلوتامين للبيئة فإن التركيز الضرورى من منظم النمو ينخفض، ويمكن للخلايا الانقسام بصور أسرع وبدون الحاجة إلى منظم النمو عند اضافة اليوريا والأمونيا أو الجلوتامين. كما تلعب صورة النتروجين دوراً فى استجابة الخلايا للاكسينات وقد يرجع ذلك إلى تأثيرها على الرقم الهيدروجينى لجدر الخلايا. ويتضح من جدول رقم (٢-١) تأثير نسبة NH_4^+/NO_3^- وكذلك النتروجين الكلى على زراعة أنسجة نباتات *Eucalyptus globulus* كما أشار (Bennett *et al.*, 2003) حيث يتضح أن استعمال ربع تركيز الأمونيا وبدون إضافة النترات وخفض تركيز الحديد إلى الربع فى بيئة MS يعطى أفضل نسبة تجذير وعدد جذور بينما انخفضت النسبة المئوية لتكوين الجذور إلى النصف تقريباً برفع تركيز الأمونيا إلى نصف تركيزها.

وفى تجربة لدراسة تأثير صورة النتروجين المعدنى فى البيئة المستعملة لإكثار صنفين من نباتات Chrysanthemum تم تغيير تركيز النتروجين الكلى لبيئة MS والتى تحتوى على ٦٠ مليمول نتروجين واستعملت تركيزات تتراوح بين ٦-٢٤٠ مليمول مع المحافظة على ثبات نسبة الأمونيا والنترات كما هى فى البيئة الأصلية. وأشارت النتائج إلى أن أعلى معدل لتكوين الأشطاء من الحامل الزهرى المستخدم كجزء نباتى كان باستعمال تركيز ٣٠-١٢٠ مليمول، وكان أقل معدل لتكوين الأشطاء عند استعمال تركيز ٦ أو ٢٤٠ مليمول اعتماداً على الصنف المنزع. ولوحظ انخفاض حاد فى عدد الأشطاء المتكونة عند زيادة تركيز النتروجين عن ١٢٠ مليمول Roest & Bokelmann (1975) ولدراسة تأثير التركيز الكلى للنتروجين على الإكثار الدقيق وإنتاج المواد الفعالة لنباتات *Ruta gravoelens* قام (Mohamed and Ibrahim, 2011) بخفض تركيز النتروجين من ٩٠ مليمول فى وسط MS إلى ٦٠ مليمول أو رفعه إلى ١٢٠ مليمول. مع المحافظة على نسبة الأمونيا للنترات ثابتة. وقد زاد الوزن الطازج للأشطاء برفع تركيز النتروجين حيث سجل ٥٨، ٦٨، و٦٩ جم/دورق باستعمال تركيز ٦٠، ٩٠، و١٢٠ مليمول من النتروجين على التوالى.

وعلى الرغم من عدم تأثر الوزن الجاف معنوياً باختلاف تركيز النتروجين فإن تركيز الروتين والفيروكيومارين فى المادة الجافة وكذلك الكمية الكلية قد زاد ت برفع تركيز النتروجين من ٦٠ إلى ٩٠ مليمول لكن قل المحصول النهائى عند تركيز ١٢٠مليمول.

جدول ٢-١: تأثير NH_4^+/ NO_3^- و FeNaEDTA فى بيئة MS على إنتاج الجذور فى مزارع أنسجة نباتات *E. globulus* كما أشار Bennett *et al.* (2003).

التركيز فى MS			% للتجذير	عدد الجذور/النبات
NH_4^+	NO_3^-	FE		
١/٤	٠	١/٤	٩٤	٥.٩
١/٤	١/٤	١/٤	٦٢	٤.٢
١/٤	١/٢	١/٤	٦٢	٣.٠
١/٢	٠	١/٤	٩٠	٤.٠
١/٢	١/٤	١/٤	٦٤	٤.١
١/٤	١/٢	١/٤	٤٩	٣.١
١/٢	١/٤	١/٢	٩٠	٣.٤

وتوضح النتائج التى أشار إليها Bennett *et al.* (2003) أن تكوين الجذور على النباتات الناتجة من زراعة أنسجة نباتات *E. globulus* والمبينة فى جدول رقم (٢-٢) أن هناك تأثيراً واضحاً لنسبة الأمونيا إلى النترات على تكوين الجذور. وكذلك كان لاختلاف مصدر النتروجين تأثيراً فى عدد الجذور المتكونة للنبات الواحد. وبين Woodword *et al.* (2006) أن لمحتوى النسيج من النتروجين والذى يتأثر بالظروف البيئية دوراً فى استجابة المُستأصَل النباتى فى الزراعة المعملية وقد لاحظ أن أعلى معدل لتكوين الجذور على أفرع *E. marginata* تحقق عند إحتواء بيئة MS على تركيز ٧.٥ مليمول من النتروجين وبنسبة ٢:١ من النترات والأمونيا على التوالى،

بالإضافة إلى ١٠ مليمول من 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid (MES) لتنظيم الرقم الهيدروجيني. وأمكن ثبات الرقم الهيدروجيني عند اضافة النتروجين في صورة نترات الفضة لكن باستعمال ١٠ مليمول من MES. ومن هذا يتضح ضرورة دراسة متطلبات كل نبات على حدى لمعرفة التركيز الأمثل من الأمونيا والنترات لنجاح تكوين الكالس وعمليات التكشف المختلفة.

ولدراسة تأثير تركيز الأمونيا والنترات على تكوين الأجنة الجسدية بزراعة السويقة الجنينية العليا لنباتات *Pelargonium zonal* رباعية التضاعف. تم تعديل تركيز نترات الأمونيوم في البيئة المستعملة من ٠.٩٤ إلى ١١.٤ مليمول. وكان لزيادة التركيز تأثير معنوى في عدد ونوعية الأجنة المتكونة. حيث زاد عدد الأجنة ذات الطور الكروى globular ليتراوح بين ٢ إلى ٣ جنين/مُستأصَل نباتي، وهي تمثل زيادة مقدارها ٢٧% عن البيئة الخالية من نترات الآمونيوم. وبينما أدى التركيز العالي ٦.٦-١١.٤ مليمول لزيادة عدد الأجنة في الطور السابق انخفض كما عدد الأجنة التي تطورت إلى الطور القلبي التوربيدى heart-torpedo وفشلت الأجنة المتكونة في تكوين الأوراق الفلقية. وكان أحسن معدل لتكوين الأوراق الفلقية هو استعمال تركيز ٢.٤ مليمول من نترات الأمونيوم (Wilson *et al.*, 1996).

٢. الفوسفور

يزيد تركيز الفوسفور في القمم الميرستيمية للنبات ويتشابه دوره مع النتروجين من حيث مدى أهميته للنبات بالرغم من إحتواء الأنسجة على كميه قليلة منه مقارنة بالنتروجين. ويدخل الفوسفور في عمليات البناء الضوئي وتكوين وانقسام الخلايا وكذلك تطور الجذور، كما أن للفوسفور دوراً أساسياً في تخليق المركبات الناقلة للطاقة. ويتم امتصاص الفوسفور امتصاصاً نشطاً من وسط النمو وتستعمل في الصورة الثلاثية المؤكسدة PO_4^{3-} . ويضاف الفوسفور إلى بيئة مزارع الأنسجة في صورة

جدول ٢-٢: تأثير استعمال مصادر مختلفة للنتروجين على التجذير نباتات *E. globulus* كما بينها Bennett *et al.* (2003).

تركيز ومصدر النتروجين (مليمول)	عدد الجذور/النبات
5 KNO_3	٢.٢
10 KNO_3	٢.٥
5 KNO_3 + 2.5 $Ca(NO_3)_2$	٢.٤
5 KNO_3 + 5 NH_4NO_3	١.٥
5 KNO_3 + 2.5 $(NH_4)_2SO_4$	٠.٩
5 KNO_3 + 1.2 $(NH_4)_2SO_4$	١.٢
5KNO3 + 0.6 (NH4)2SO4	٢.٢

فوسفات الصوديوم أو البوتاسيوم أحادية أو ثنائية الهيدروجين. ويتم تحول الفوسفور بين الصورة الأحادية والثنائية التكافؤ لهذه الأملاح فى البيئة اعتماداً على الرقم الهيدروجينى. فعندما يكون الرقم الهيدروجينى اقل من ٧ تكون الصورة الأحادية $H_2PO_4^-$ هى السائدة والممتصة، وبزيادة قلوية الوسط تتحول هذه الصورة إلى الصورة الثنائية HPO_4^{2-} الأقل امتصاصاً. لكن يعتقد أن الصورة الثنائية لها قابلية للارتباط بمواقع الامتصاص على سطح الخلايا بدرجة أعلى من الأحادية مما يزيد من امتصاصها. أما الصورة الثلاثية PO_4^{3-} الموجود فى الوسط القلوى فهى غير ممتصة، لكنها قد تصبح ميسرة للامتصاص عن طريق إنزيمات الفوسفاتيز التى تفرز من الأنسجة (George, 1993).

تحتوى معظم البيئات على تركيز ١.٣-١.٧ مليمول من الفوسفور والذى يضاف غالباً فى صورة فوسفات البوتاسيوم وفوسفات الصوديوم المائية (KH_2PO_4 + $NaH_2PO_4.2H_2O$). وقد لاحظ (Leifert *et al.*, 1995) أنه بالرغم من عدم كفاية محتوى بيئة MS من الفوسفور لنمو مزارع أنسجة نباتات *Hemerocallis* و *Iris* و *Delphinium* كان للمزرعة القدرة على النمو لبعض الوقت بعد استنفاذ الفوسفور من

الوسط. ومن ثم ينصح برفع تركيز الفسفور فى هذه البيئة إلى ٣.٧١ مليمول لزيادة معدل تكوين الأشطاء. وقد يسبب الاستهلاك المبكر للفوسفات من البيئة فى المراحل الأولى من النمو تغيير رقمها الهيدروجينى. لكن يجب ملاحظة أن زيادة الصورة الميسرة من الفوسفات ربما تؤدى إلى تثبيط النمو فى مزارع الأنسجة نظرا لترسيب الكالسيوم وبعض العناصر الأخرى.

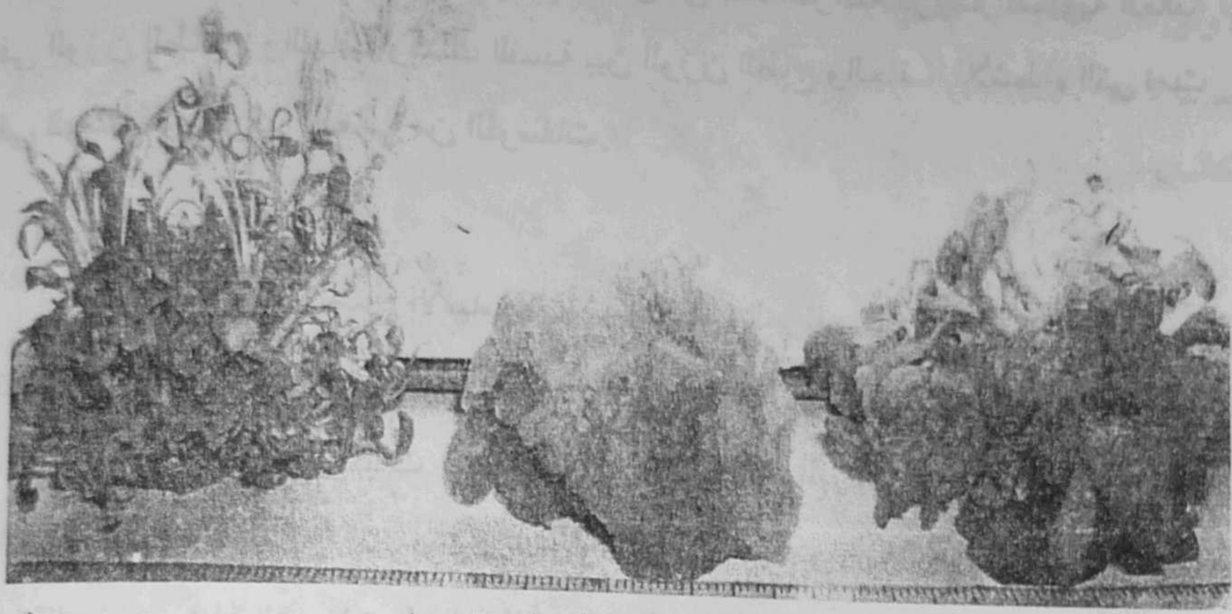
وقد أدى نزع الفوسفات كلياً من بيئة MS زيادة تركيز الأحماض الأمينية الحرة فى معلق خلايا الدخان وتوقف تخليق البروتين وزاد معدل تكسيره. ومن البديهى أن يتوقف معدل امتصاص الفوسفور على النوع النباتى ومعدل النمو، ففى معلق خلايا نباتات *Catharanthus roseus* المنزرع فى بيئة MS المعدلة لتحتوى على تركيزات متباينة من الفوسفور زادت مدة النمو بزيادة تركيز الفوسفات إلى ٢.٦٤ مليمول. كما وجد أن تركيز ٢.٥١ مليمول من الفوسفات غير كافى لبعض النباتات وتزيد سرعة النمو والتكشف بزيادة الفوسفات إلى أن يصل إلى الحد الأمثل لكل نبات. ويعتبر تركيز الفوسفور فى بيئة MS غير كافياً لبعض النباتات إذا كان معدل النمو عالياً مع استعمال كمية قليلة من البيئة، حيث ينخفض تركيز الفوسفات بسرعة. وقد سجل Leifert *et al.* (1995) انخفاض فى تركيز الفوسفات إلى حد لا يكفى نمو المزارع التى سبق الإشارة إليها بعد عدة أسابيع من الزراعة وبالرغم من ذلك يمكن أن يستمر النمو لبعض الوقت حيث يمتاز الفوسفات بأنه عنصر متحرك ينتقل من الأنسجة المسنة إلى الحديثة. ولتحسين معدل التكشف عدة أصناف من العنب قام Mhatrea *et al.* (2000) برفع تركيز الفوسفات فى وسط MS إلى ٢١٨ ملجم/لتر من فوسفات الصوديوم الأحادية. كما كان لمضاعفة تركيز أملاح MS تأثير مشجع على إكثار نباتات *Prunus avium* وتوقف ذلك على تركيز ومعدل امتصاص كلاً من النتروجين والفوسفور (Ružić *et al.*, 2000). وقد امكن التغلب على ظاهرة التميؤ الزجاجى مع زيادة عالية جداً فى معدل تكوين الأشطاء تصل إلى ثلاث أضعاف (٣٤ فرع/مُستأصل) برفع تركيز

الفوسفات فى بيئة MS إلى ٥.٣٧ (شكل رقم ٢-٢). وإذا كان لزيادة تركيز الفوسفات تأثيراً ايجابياً للنمو فى مزارع أنسجة النبات المستهدف فينصح بدراسة التأثير المشجع الميوانسيتول (Mohamed, 2011). وقد تبين فى هذه الدراسة الزيادة المعنوية العالية فى الوزن الطازج والجاف وكذلك النسبة بين الوزن الطاج والجاف للأشطاء التى نمت فى الوسط ذو التركيز العالى من الفوسفات.

٣. البوتاسيوم

وهو من العناصر الأساسية ذات التركيز المرتفع فى الأنسجة النباتية، وقد تفوق الكمية الممتصة منه باقى العناصر الأساسية عدا النتروجين على الرغم من عدم اشتراكه فى تخليق المركبات العضوية داخل النبات. وللبوتاسيوم دور مهم من حيث انقسام الخلايا وتكوين الكربوهيدرات والبروتين وبعض الإنزيمات والكلوروفيل، وكذلك فى معادلة الشحنات السالبة للأيونات العضوية وغير العضوية. ويمر البوتاسيوم بعد امتصاصه بسرعة عبر الغشاء الخلوى ليلعب دوراً أساسياً فى تنظيم الرقم الهيدروجينى والضغط الاسموزى للخلايا لأن أيونات البوتاسيوم، والكالسيوم والكلور تحتفظ بشحنتها داخل النبات على العكس من NH^{+}_{4}, SO_4^{2-}, $H_2PO_4^{-}$ التى تشارك فى تكوين المركبات العضوية بسرعة. ويؤدى نقص البوتاسيوم إلى نقص ضغط الامتلاء للخلايا وبذلك تصبح الأنسجة رخوة وحساسة للإجهاد المائى والملوحة. يتحرك أيون البوتاسيوم فى النبات مصاحباً لأيون النترات فى الخشب وعند اختزال النترات إلى آمونيا تتكون أحماض عضوية $R\text{-}CO_3$ ويصاحبها أيون البوتاسيوم فى اللحاء حتى الجذر حيث يتم نزع مجموعة الكربوكسيل ومعادلتها بالهيدروكسيل. ثم يرتبط أيون البوتاسيوم بأيون نترات جديد ويتحرر أيون الهيدروكسيل لمعادلة ايون النترات الممتص وبذلك يحافظ على الرقم الهيدروجينى للوسط. ويلعب البوتاسيوم نفس الدور فى مزارع الأنسجة لكن تظل ميكانيكية النقل غير واضحة بصورة تامة. ويؤدى نقص البوتاسيوم فى البيئة إلى ظاهرة التميؤ الزجاجى ونقص امتصاص الفوسفات. ويلاحظ

من جدول رقم (٢-٣) أن البوتاسيوم هو الأيون السائد فى معظم البيئات بعد أيون النتروجين (Dixon & Gonzades, 1994).



شكل ٢-٢: ظاهرة التميؤ الزجاجى فى مزارع أشطاء القرنفل *Dianthus caryphyllus* فى الوسط وفى اليمين يلاحظ اختلاط النمو بين الطبيعى والمتميئ فى بيئة MS، أما فى اليسار فيلاحظ النمو الطبيعى مع زيادة فى التكشف برفع تركيز الفوسفات فى بيئة MS إلى ٦.٤٥ مليمول.

لكن أشار (Loreti *et al.*, 1988) إلى عدم تأثير رفع تركيز البوتاسيوم فى بيئة MS على نمو مزارع *Prunus persica*. وغالباً يضاف البوتاسيوم للبيئة فى صورة نترات البوتاسيوم وفوسفات البوتاسيوم KNO_3 و KH_2PO_4 وأحياناً كلوريد البوتاسيوم.

٤. الماغنسيوم

يدخل الماغنسيوم فى تكوين جزئ الكلوروفيل بنسبة ١٥-٢٠%، وكذلك يساهم فى تنشيط عديد من الإنزيمات خاصة تلك المنوط بها انتقال الفوسفات وحركة السكريات داخل النبات وتمثيل الأحماض النووية. وبجانب هذا الدور المغذى يلعب الماغنسيوم دوراً فى الاتزان الأيونى فى النبات. وتحتوى بيئات مزارع الأنسجة على تركيز منخفض نسبياً من الماغنسيوم يتراوح بين ٠.٧٥١-١.٦٢٣ مليمول، ويضاف

غالباً فى صورة كبريتات الماغنسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$. وبإنخفاض تركيز الماغنسيوم فى البيئة المستخدمة لإنتاج الأجنة الجسدية فى كالوس نباتات *Medicago sativa* قل عدد الأجنة المتكشفة. وسجل Kintzios *et al.* (2004) ارتفاع فى محتوى مزارع الأجنة الجسدية لنباتات البطيخ من الماغنسيوم بالمقارنة مع مزارع الكالس، مما يشير إلى دوره فى تكشف الأجنة الجسدية. ولاحظ Ohki & Sawaki (1999) أن الأشطاء المتكشفة من زراعة مستأصلات من الحامل النورى لنبات *Delphinium cardinale* فى بيئة MS ضعيفة النمو شاحبة اللون بسبب انخفاض تركيز الماغنسيوم أو الحديد. ومن ثم تم رفع تركيز كلاهما مع ثبات تركيز الأمونيا والنترات أو خفض تركيز الأمونيا ورفع تركيز النترات للمحافظة على نفس التركيز الكلى للنتروجين المعدنى وهو ٦٠ مليمول. وتوضح النتائج المبينة فى جدول رقم (٢-٤) تأثير الماغنسيوم، والحديد على عدد الأشطاء المتكونة ووزنها وكمية الكلوروفيل فى أوراق النباتات المتكشفة.

٥. الكبريت

ينتشر الكبريت بانتظام بين أعضاء وأنسجة النباتات المختلفة فهو أحد مكونات بعض الأحماض الأمينية مثل السستين والسستئين والتى تدخل فى تكوين البروتين وبعض الفيتامينات كالثيامين. والجزء الأكبر من الكبريت يوجد فى الكلوروبلاست.

٦. الكالسيوم

يعتبر أيون الكالسيوم Ca^{2+} أحد الكاتيونات السائدة فى النبات خصوصا بالعصير الخلوى. ويتم تثبيت معظم الكالسيوم الممتص فى جدر الخلايا فى صورة بكتات الكالسيوم التى تكون الصفيحة الوسطى الضرورية فى انقسام الخلايا. كما يساعد الكالسيوم أيضاً فى حركة الكربوهيدرات والأحماض الأمينية خلال النبات. وللكالسيوم دوراً فى التخلص من بعض نواتج الأيض حيث يتحد مع بعض المركبات السامة

كحامض الاكسالك ليكون اكسلات الكالسيوم. ويعتمد تكوين إنزيم β-(1,3) glucan الهام فى أيض السيليلوز على وجود الكالسيوم، لذا فإن تكوين السيليلوز فى خلايا مزارع الأنسجة لا يتم إلا فى وجود الكالسيوم فى البيئة. كذلك فإن نشاط بعض الإنزيمات والتفاعلات الفسيولوجية التى تحدثها الأوكسينات والسيتوكينينات لا يتم فى غياب الكالسيوم من الوسط. وعلى الرغم من أن الكالسيوم يوجد فى السيتوبلازم بتركيز واحد مليمول فإن النبات يقوم بضخه الكالسيوم إلى الفجوات العصارية ليحافظ على تركيز ٠.١ ميكرومول لتفادى ترسيب الفوسفات فى السيتوبلازم وكذلك إعاقة عمل أيون الماغنسيوم.

للكالسيوم دور هام فى تكشف الأعضاء فى مزارع الأنسجة من خلال تأثيره على الفعل الحيوى لمنظمات النمو. حيث يزيد السيتوكينين من ارتباط الكالسيوم بالجدر الخلوية فى المناطق التى تتكشف منها البراعم العرضية لاحقا. وقد لاحظ Capitiani and Altamura (2004) أن إضافة الكالسيوم تشجع تكوين المناطق الميرستيمية التى تعتبر الطور الأول لتكوين الأشطاء عند زراعة نخاع الدخان. ولأن الكالسيوم غير متحرك داخل الأنسجة النباتية، فإن الأفرع حديثة التكشف تحتاج إلى تركيز ثابت منه فى العصارة المتدفقة. وتتضح أعراض نقص الكالسيوم فى المزرعة بعد عدد مرات تكرار الاستزراع على هيئة إصفرار ويتبع ذلك موت القمم النامية وتكوين مزيد من الأفرع الجانبية وغالباً يصاحب ذلك ظاهرة التميؤ الزجاجى. وكان لزيادة تركيز الكالسيوم فى بيئة MS بإضافة ٢.٥ مليمول باستعمال كلوريد الكالسيوم مع اضافة ٢٠٠ مليمول من البورن دوراً فعالاً فى التغلب على مشكلة موت القمم النامية لنباتات *Haloxylon persicum* كما أشار (Mohamed *et al*., 2013).

وحيث أن أعراض نقص الكالسيوم قد تعزى إلى بطء إمتصاصه أو إنتقاله بسبب ارتفاع الرطوبة النسبية فى الفراغ الغازى للمزرعة (Roche & Cassells,

1996) فإن العمل على خفض الرطوبة النسبية فى جو المزرعة وبالتالى زيادة معدل النتح باستعمال ظروف بيئة خاصة يقلل من أعراض نقص الكالسيوم فى نباتات *Helianthus tuberosus*. لكن أشار (Mohamed *et al.*, 2013) إلى عدم فاعلية زيادة معدل تهوية أوعية الزراعة بهدف خفض المحتوى الرطوبى فى التخلص من مشكلة موت القمم النامية. وقد يستعمل تركيز أعلى من الكالسيوم لنفس الغرض، لكن يتوقف التركيز الأمثل على التركيب الوراثى للنبات ففى بعض الحالات لم يكن لإضافة المزيد من الكالسيوم تأثيراً فى النمو أضف إلى ذلك أن المزيد من الكالسيوم فى صورة كلوريد قد يسبب ظهور أعراض التسمم بالكلوريد. ويضاف الكالسيوم إلى بيئات زراعة الأنسجة فى صورة كلوريد الكالسيوم المائى $CaCl_2.2H_2O$ أو نترات الكالسيوم المائية $Ca(NO_3)_2.4H_2O$.

ب. العناصر المغذية الصغرى Microelements

وهى لا تقل فى أهميتها عن العناصر الكبرى لكن تحتاجها النباتات بتركيزات منخفضة مقارنة مع تلك الكبرى. وقد اتضح مدى أهمية العناصر المغذية الصغرى للنبات خلال النصف الأخير من القرن الماضى. وتضم هذه المجموعة الحديد، النحاس، المنجنيز، الزنك، الكوبلت، النيكل، اليود، المولبدنيم. وترجع فاعلية تلك العناصر لقدرتها على تغيير تكافؤها داخل النبات مما يزيد من نشاط الإنزيمات الضرورية للكثير من العمليات الحيوية. وللعناصر الصغرى أهمية فى نشاط بعض الهرمونات وعمل الجهاز الوراثى للخلية. وفى بداية تطوير علم زراعة الأنسجة لم تضاف تلك العناصر للبيئة، وعلى الرغم من ذلك لم تظهر أعراض نقصها على الأنسجة. ويرجع ذلك لعدم نقاوة الكيماويات المستخدمة آنذاك والتى كانت تعتبر مصدراً لتلك العناصر.

جدول ٢-٣: تركيز أيونات العناصر الكبرى فى البينات شائعة الاستعمال (Dixon & Gonzades, 1994).

البينات/ التركيز بالمليمول							الأيون
Knop[1]	Knudson[2]	Heller[3]	Nitsch[4]	B[5]	SH[6]	MS[7]	
١٠.٩٤٢	١٦.٠٣٦	٧.٠٥٨	٢٧.٣٨٥	٢٦.٧٥٦	٢٧.٣٣٦	٦٠.٠١٧	N-total
-	٧.٥٦٧	-	٨.٩٩٤	٢.٠٢٨	٢.٦٠٨	٢٠.٦١٢	NH^{+}_{4}
١٠.٩٤٢	٨.٤٦٩	٧.٠٥٨	١٨.٣٩١	٢٤.٧٢٨	٢٤.٧٢٨	٣٩.٤٠٥	NO^{-}_{3}
١.٨٣٧	١.٨٣٧	٠.٩٠٦	٠.٥٠٠	١.٠٨٧	٢.٦٠٨	١.٢٤٩	$H_2PO^{-}_{4}$
٤.٣١٠	١.٨٣٧	١٠.٠٦٠	٩.٨٩٧	٢٥.٨١٥	٢٤.٧٢٨	٢٠.٠٤٢	K^{+}
٤.٣٢٤	٤.٢٣٤	٠.٥١٠	١.٤٩٦	١.١٦٣	١.٣٦٠	٢.٩٩٣	Ca^{2+}
١.٠١٤	١.٠١٤	١.٠١٤	٠.٧٥١	١.٠١٤	١.٦٢٣	١.٥٠١	Mg^{2+}
١.٠١٤	٤.٧٩٨	١.٠١٤	٠.٧٥١	٢.٠٢٨	١.٦٢٣	١.٥٠١	SO^{2-}_{4}
-	-	٧.٩٦٤	-	-	-	-	Na+
-	-	١١.٠٨٠	٢.٩٩١	٢.٣٢٥	٢.٧٢١	٥.٩٨٦	Cl^{-}
٢٣.٣٥١	٢٩.٧٥٦	٣٩.٦٠٦	٤٣.٧٧١	٦٠.١٨٨	٦١.٩٩٩	٩٣.٢٨٩	Total

[1] White (1884), [2] Knudson (1946), [3] Heller (1953), [4] Nitsch (1972), [5] Gamborg *et al.* (1986), [6] Schenk and Hildebrandt (1972) and [7] Murashige and Skoog (1962).

جدول ٢-٤: تأثير تغير تركيز الأمونيا والماغنسيوم والحديد فى بيئة MS على الإكثار الدقيق لنبات *D. cardinale* كما أوضحها (1999) Ohki & Sawaki.

التركيز فى بيئة MS مليمول Mg^{2+}	Fe^{3+}	NH^{+}_{4}	عدد الأشطاء/مستأصل نباتى	الوزن الطازج للأشطاء (ملجم)	كلوروفيل أ+ب (ميكروجرام/جم وزن طازج)
١.٥	٠.١	٢٠.٦	٣.٧	٢٨٧.٨	٣٠٧
١.٥	٠.٢	٢٠.٦	٣.٦	٢٣١.٠	١٤٩٣
٢.٠	٠.١	٢٠.٦	٢.٨	١٧٦.٠	٨٤١
١.٥	٠.١	١٠.٣	٤.١	٢٨٨.٩	٦٤٥
١.٥	٠.١	١٣.٧	٤.٩	٣٣٣.٣	١٠٢٧

وربما تحتاج بعض المزارع إلى تركيز أعلى من العناصر الصغرى عن الكميات المستعملة فى معظم البيئات مثل MS، فعلى سبيل المثال تطلب تكشف الأشطاء من كالوسات ٥٤ طرز وراثى لنباتات *Glycine max* اضافة أربعة أمثال تركيز العناصر الصغرى للبيئة المشار إليها (Barwale *et al.*, 1986). ويشير Gislerod *et al.* (2005) إلى أن زيادة تركيز عناصر Fe و Mn و B و Cu و Zn و Mo فى بيئة MS المستخدمة لإكثار أغلب نباتات الزينة سوف يشجع تكوين نباتات ذات جودة عالية. ووجد Bouman &Tiekstra (2005) أن مضاعفة تركيز النحاس ١٦ ضعف تركيزه فى بيئة MS كان له تأثير ايجابى كبير فى نمو العديد من المزارع . وعلى الرغم من ذلك أدى خفض تركيز العناصر الصغرى عدا الحديد فى بيئة MS إلى ظاهرة التميؤ الزجاجى فى القرنفل لكن لم يكن لذلك جدوى فى نباتات Gerbera .

وعموماً تزداد حاجة الخلايا لتلك العناصر خلال مرحلة التكشف فقد يتكون الكالس دون تكشف إلا فى وجود تلك العناصر. ولعل من المفيد أن نستعرض الدراسة

التالية عن تأثير تعديل تركيز العناصر المعدنية فى بيئة النمو والمعتمد على تحليل أنسجة نبات *Saintpaulia ionantha* على استجابتها فى مزارع الأنسجة وكذلك بعد نقلها إلى الصوبة (Gislerod *et al.*, 2005). فقد تم إكثار النباتات فى البيئات الثلاثة المبينة فى جدول رقم (٢-٥). وكررت التجربة ٦ مرات ووضحت النتائج وجود اختلافات كبيرة بين البيئات الثلاثة من حيث معدل النمو فى المعمل والبقاء بعد الأقلمة وتعدى الأمر ذلك إلى حجم النبات وبدء التزهير فى الصوبة. وكانت البيئة المعدلة RS-1997-3 افضل الثلاث بيئات المختبرة وبدءت النباتات فى التزهير بعد ٧١ يوم فقط فى حين ازهرت النباتات التى تم إكثارها فى بيئة MS المعدلة بعد ١٠٤ يوم (جدول رقم ٢-٦) وبالطبع فإن لميعاد الإزهار وحجم النبات أهمية كبيرة فى التسويق التجارى لهذه النباتات بالإضافة إلى خفض فترة بقائها فى الصوبة. لكن يجب الحذر فقد تسبب زيادة تركيز العناصر الصغرى عن الحد الأمثل ظهور أعراض السمية على الأنسجة.

١. الزنك

وهو يوجد فى جميع أجزاء النبات لأنه عامل أساسى في نشاط العديد من الإنزيمات المسئولة عن تكوين الكلوروفيل. كما يرتبط إنتاج هرمون أندول حامض الخليك IAA بتوفير الزنك لأنه يدخل فى تخليق الإنزيمات الفعالة فى تصنيع حامض التربتوفان، والذى يعتبر بادئ لتخليق IAA. ومن ثم فإن النباتات التى تتضح عليها أعراض نقص الزنك تعانى من نقص تخليق البروتين والأحماض النووية والكلوروفيل. ويضاف الزنك لبيئة مزارع الأنسجة بتركيز ما بين ٠.١-٧٠ ميكرومول فى صورة سلفات الزنك المائية $ZnSO_4.7H_2O$. وقد لاحظ Hossain *et al.* (1997) زيادة معدل نمو معلق خلايا الأرز بسبب نشاط IAA عند رفع تركيز الزنك فى بيئة النمو إلى ٥٢٠ ميكرومول. وفى مزارع أشطاء Eucalyptus كان للزنك أهمية فى تكشف الجذور العرضية لكن قد تسبب الزيادة الكبيرة منه تثبيط نمو الجذور (Schwambach *et al.*,

(2005. ولعل التباين الكبير فى تأثير تركيز الزنك على نمو الجذور راجعاً إلى اختلاف حساسيتها لتأثير IAA.

٢. المنجنيز

يعتبر المنجنيز واحداً من أهم العناصر الصغرى إذ يلعب دوراً فى تكوين أغشيه الكلوروبلاست، لذا تتضح أعراض نقصه فى اصفرار الأوراق. كما يثبط نقص المنجنيز نشاط الكثير من الإنزيمات مثل الديهدروجنيز والديكربوكسيلز. ويتشابه نشاط أيون المنجنيز كثيراً مع الماغنسيوم ويمكن أن يحل محله فى تنشيط بعض الإنزيمات، لكن تركيز الماغنسيوم فى خلايا النبات أعلى بمعدل ٥٠-١٠٠ مرة من المنجنيز. وقد يستهلك النبات المزيد من أيون المنجنيز بانخفاض الموليبدنيوم والعكس صحيح. ويؤثر وجود أيون المنجنيز على عمليات التكشف حيث أدى خلو البيئة المستخدمة فى زراعة الأوراق الفلقية للخس إلى انخفاض عدد البراعم المتكونة.وقد يفسر ذلك بأن زيادة تركيز أيون المنجنيز تنشط الإنزيمات المؤكسدة لاندول حامض الخليك IAA وبالتالى انخفاض تركيز IAA بينما لا تتأثر الأوكسينات المصنعة بذلك. وتحتوى معظم البيئات على تركيز ٢٥-١٥٠ ميكرومول من تركيز أيون المنجنيز، والذى يضاف فى صورة كبريتات المنجنيز المائية $MnSO_4.7H_2O$.

٣. البورون

يقوم البورون بتنشيط العديد من الإنزيمات وانقسام الخلايا والعمل على زيادة مسامية الجدر وإنتقال الكربوهيدرات، وبالتالى يحدث تراكم للنشا فى حالة نقص البورون. كما أن للبورون أهمية فى أيض المركبات الفينولية لدوره كعامل مساعد للإنزيمات المسئولة عن أيض حامض P-coumoric، ويدخل البورون فى تكوين الحامض النووى الريبوزى RNA والقواعد النتروجينية اللازمة لانقسام الخلايا وتكوين القمم النامية.

جدول ٢-٥: تركيب ثلاث بيئات استخدمت لإكثار نباتات *S. ionantha* كما وجدها Gislerod *et al.* (2005).

المركب	التركيز فى بيئات (ملجرام/لتر)		
	RS-1997-1	M. *et al.* (1972)	RS-1997-3
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	١٣٠٠	-	١٢٠٠
NH_4NO_3	٨٠٠	١٦٥٠	٨٠٠
KNO_3	١٢٠٠	١٩٠٠	٨٠٠
$CaCl_2.2H_2O$	٤٠	٤٤٠	-
$MgSo_4.7H_2O$	٧٥٠	٣٧٠	٧٥٠
KH_2PO_4	٤٠٠	١٧٠	٣٠٠
NaH_2PO_2	-	١٧٠	-
$(NH_4)_2SO_4$	٣٩٦	-	٢٦٤
NaFe.EDTA	٤٠	٤٠	٤٠
H_3 BO_3	١٨.٦	٦.٢	١٢.٤
$MnSo_4.$ H_2O	١٦.٨	١٦.٨	٢٥.٢
$ZnSO_4.7H_2O$	٨.٦	٨.٦	١.٧٢
KI	٢.٥	٠.٨٣	١.٦٦
$Na_2MoO_4.2H_2O$	٠.٧٥	٠.٢٥	٠.٢٥
$CuSo_4.5H_2O$	٠.٢٥	٠.٠٢٥	٠.٢٥
$CoSO_4.7H_2O$	٠.١	٠.٠٢٥	٠.٠٢٥
EC	٦.٢٧	٦.٤٨	٥.٣٠

ويعتقد أن للبورون دور فى ثبات المركبات المخلبية الطبيعية اللازمة لبناء الجدر والأغشية الخلوية ونشاطها الفسيولوجى. لكن يزيد تخليق الكامبيوم ونمو البراعم الجانبية مما يعطى النبات الشكل المتورد بنقص البورن فى بيئة النمو.

جدول ٢-٦: تأثير تركيب ثلاث بيئات استخدمت لإكثار نباتات *S. ionantha* على نموها فى المعمل وبعد النقل للصوبة (Gislerod *et al.*, 2005).

البيئة	عند النقل (للوعاء)			بعد النقل للصوبة		
	مساحة النبات (سم^2)	تفتح أول زهرة (يوم)	ظهور أول برعم (يوم)	% للبقاء	عدد الأشطاء	الوزن الجاف (جم)
RS-1997-1	١٦١.١	١١٢.٢	١٠٤.٢	٥٠.٤	٤٢	١١.٢
M. *et al.* (1972)	١٩٨.٢	٩٣.٤	٨٥.٢	٨٧.٥	٤٩.٩	١٤.٢
RS-1997-1	٢٤٥.٥	٨٠.٠	٧١.٦	٨٩.٩	٦٢.١	١٥

يمتص النبات البورون والذى يصل تركيزه فى أغلب البيئات إلى٥٠-١٠٠ ميكرومول فى صورة حامض البوريك H_3BO_3 وتؤدى زيادة تركيز البورون عن ذلك إلى ظهور أعراض السمية على الأنسجة المنزرعة. أما فى حالة إنبات حبوب اللقاح معملياً وحالات نادرة من مزارع الأشطاء والكالس فإن البورون يضاف بتركيز يصل إلى ٦٤٦ ميكرومول. وباستعمال تركيز ٢٠٠ مليمول من البورن مع ٢.٥ مليمول كالسيوم تمكن (Mohamed *et al.*, 2013) من التغلب على مشكلة موت القمم النامية لنباتات *Haloxylon persicum*. وقد يلعب البورون دوراً مساعداً للأوكسينات فى تكشف الجذور (Schwambach *et al.*, 2005) لكن لم يلاحظ تأثيراً للبورون فى تكشف الجذور على العقل الدقيقة لنباتات Eucalyptus. وفى حالة إضافة السكريات الكحولية مثل المانيتول فإن البورون يتحد معها ليكون معقد وتظهر أعراض نقصه بعد فترة لذا يجب استبدال السكريات الكحولية بالسكر بعد فترة من الزراعة لتفادى ذلك.

٤. النحاس

تحتوى النباتات عموماً على تركيز منخفض جداً من النحاس الذى يوجد فى صورة أحادية أو ثنائية التكافؤ حيث يتم أكسدة الصورة الأحادية إلى الثنائية أو اختزال الثنائية إلى أحادية بسهولة داخل الأنسجة. ويرتبط النحاس بعديد من الإنزيمات خصوصاً إنزيمات السيتوكروم مثل السيتوكروم أكسيديز المسئول عن الأكسدة أثناء التنفس وكذلك إنزيمات أكسدة مركبات الفينول كحامض الأبسيسك ABA والذى يعتبر من مثبطات النمو الطبيعية. وتؤدى أكسدة المركبات أحادية الفينول بالإنزيمات المحتوية على أيون النحاس إلى تكوين الصبغات البنية والسوداء اللون فى بعض مزارع الأنسجة. وهى ظاهرة غير مرغوبة حيث تعتبر هذه المواد سامة للأنسجة وتعيق النمو والتكشف. ويؤدى نقص النحاس من مزارع الأنسجة إلى تقزم وتشوه النمو. تحتوى بيئة زراعة الأنسجة على تركيز يتراوح بين ٠.١-١٠٠ ميكرومول من النحاس والذى يضاف فى صورة كبريتات النحاس المائية $CuSO_4.5H_2O$. وقد لوحظ أن نقص النترات يسبب انخفاض معدل امتصاص النحاس. وبالنظر إلى محتوى النباتات من النحاس يلاحظ الإنخفاض الشديد فى مكونات البيئات المختلفة منه. وعلى هذا لاحظ البعض أن زيادة تركيز النحاس إلى خمس أضعاف التركيز الشائع قد تشجع من النمو (Bouman & Tiekstra, 2005). لكن قد تسبب التركيزات العالية أعراض السمية على المزرعة، وقد شاهد Kumar *et al.* (2003) انخفاض معدل نمو أشطاء نباتات *Tinospora cordifolia* عند زيادة تركيز النحاس إلى ١٢٥ مليمول.

٥. الموليبد نيوم

يوجد الموليبدنيوم بكمية قليلة فى أنسجة النبات على الرغم من دوره المهم فى تمثيل النتروجين واختزال النترات، حيث يعمل كعامل مساعد لإنزيم النتروجينيز والنترات ريدكتيز وتثبيت النتروجين فى النباتات البقولية. ويمتص النبات الموليبدنيوم

فى صورة أيون MoO_4^{2-} والذى يضاف إلى مزارع الأنسجة فى صورة موليبدات الصوديوم المائية $NaMoO_4.2H_2O$ بتركيز يصل إلى مليمول واحد، والتركيزات المرتفعة نسبياً والتى تصل إلى ١٠ ميكرومول تكون سامه. أما عند نقص الموليبدنيوم فى البيئة تظهر أعراض التسمم بالنترات على الأنسجة لعدم اختزالها إلى آمونيا.

٦. الكوبلت

يدخل الكوبلت فى تكوين معقد فيتامين B12 الهام فى تثبيت النتروجين. وعلى الرغم أن الكوبلت لا يصنف ضمن العناصر الأساسية فإن أغلب البيئات التى تستعمل فى مزارع الأنسجة تحتوى على تركيز حوالى ٠.١-١ ميكرومول منه حيث يعتقد أن له دور فى تنظيم عملية التكشف. لكن من الصعب الحصول على تأكيد لدور الكوبلت فى تكوين الأحماض الأمينية فى مزارع الأنسجة (George & De-klerk, 2008). وقد ترجع أهميته فى مزارع الأنسجة إلى تثبيط بعض عمليات الأكسدة التى تتم بوجود الكوبلت أو الحديد وكذلك تثبيط إنتاج غاز الإثيلين. ويضاف الكوبلت فى صورة كلوريد الكوبلت المائى $CoCl_2.6H_2O$ بتركيز حوالى ٠.٠٢٥٠ ملجم/لتر.

٧. اليود

ليس من المعتاد اعتبار اليود عنصراً أساسياً لنمو النبات رغم وجوده فى بعض الأحماض الأمينية ودوره فى نمو الجذور ربما لنشاطه كعامل مختزل. وقد أدت زيادة تركيز اليود من ٠.٥-٠.٠٠١ ميكرومول إلى منع اسوداد مزرعة نخيل جوز الهند وتحسين نمو الكالس. وعلى ذلك أضيف اليود إلى حوالى ٦٥% من البيئات التى استخدمت فى مزارع الأنسجة فى صورة يوديد البوتاسيوم أو أى صورة أخرى مثل Iodeacetate حيث يتحرر منها اليود بالتحلل المائى. لكن لم يسجل تاثير سلبى على نمو الكثير من مزارع الأنسجة باستعمال بيئة خالية منه.

٨. النيكل

لم يكن هناك إدراك لأهمية النيكل والألومنيوم لمزارع الأنسجة عند تحديد تركيب معظم البيئات التى استعملت فى مزارع الأنسجة لكن أشار Gerendas *et al.* (1999) إلى ضرورة النيكل للنمو لأنه يدخل فى نشاط إنزيم اليوريز الذى يحول اليوريا إلى الأمونيا وبالتالى يحسن من نمو أشطاء البطاطس (Witte *et al.*, 2002). كذلك لوحظ تحسن فى النمو واستجابة الأنسجة المنزرعة من النباتات البقولية عند إضافة النيكل لمزارع أنسجة البقوليات. ولا يضاف النيكل مباشرة إلى مزارع الأنسجة إلا أنه يوجد كشوائب فى الأجار المستعمل لتصلب البيئة.

٩. الكلوريد

يلعب الكلوريد وهو من الأيونات المتحركة فى النبات دوراً فى تنشيط بعض العمليات الفسيولوجية مثل المحافظة على ضغط الامتلاء والاتزان الأيونى كذلك البناء الضوئى، لكن آلية هذا التنشيط غير معروفه على وجه الدقة. وتحتاج النباتات إلى كميات قليلة جدا من الكلوريد لكنها قد تتحمل تركيزات عالية نسبياً دون ظهور أعراض التسمم. والتركيز الشائع استخدامه فى مزارع الأنسجة من الكلوريد هو ٣ ميكرومول وقد يصل إلى ٦ ميكرومول فى حالة زراعة الأعضاء المتكشفة. وتؤدى التركيزات العالية منه خصوصا فى أنسجة الأشجار المنزرعة معمليا إلى اصفرار الأوراق وضعف السوق وظاهرة التميؤ الزجاجى والتى تزول بخفض تركيزه. وقد حاول البعض إزالة الكلوريد من البيئة ولكى يتم ضبط الاتزان الأيونى استعملت SO_4^{2-} بتركيز أعلى حيث زادت كمية سلفات الأمونيوم بدلاً من كلوريد الأمونيوم وبذلك زاد تركيز السلفات من ١:١٦ ميكرومول لكن سبب ذلك تأثير غير مرغوب.

١٠. الحديد

للحديد قدرة عالية على التأكسد والاختزال داخل النبات، وبذلك له تأثيرات فسيولوجية مهمة فيدخل فى نشاط عديد من الإنزيمات خصوصاً النشطة فى عمليات التنفس. وعلى الرغم من عدم اشتراك الحديد فى تركيب الكلوروفيل إلا أنه مهم فى تكوينه والحفاظ عليه، حيث يشترك الحديد فى تكوين بروتينات الحديد ferredoxin protein وهى الناقله للإلكترونات فى عملية البناء الضوئى. وكان الحديد فى بداية استعماله فى بيئات زراعة الأنسجة وقبل استخدام المركبات المخلبية يضاف فى صورة Fe^{2+} أو Fe^{3+} باستعمال سلفات الحديدوز أو طرطرات الحديديك. ورغم الخصائص المخلبية لحامض الستريك والطرطريك فلم يحققا حفظ الحديد فى صورة ميسرة للأنسجة فى البيئة. حيث لا ينفرد الحديد مرة أخرى بعد ارتباطه بهما إلا إذا تم خفض الرقم الهيدروجينى وهو الأمر غير المتاح فى المزرعة خصوصاً فى الظروف الهوائية. وباكتشاف واستخدام المركبات المخلبية فى مزارع الأنسجة فى الخمسينيات لوحظ تحسن فى النمو وتكوين الأفرع فى بيئات عديدة كان من غير الممكن استعمالها للتكشف. ولهذا أصبح الحديد لا يضاف إلا فى الصورة المخلبية المعروفة ومنها EDTA و EGTA و EDDAH و DTPA . وعلى الرغم أن الحديد يتم امتصاصه فى الصورة الحرة كمركب غير معقد من المركبات المخلبية إلا أن هناك تأكيدات أن المركبات المخلبية نفسها تمتص بواسطة الأنسجة المنزرعة.

وعند التركيزات المنخفضة وجد تأثير متشابه لمركب EDTA مع الأوكسينات وقد فسر ذلك بارتباط العامل المخلبى مع الكالسيوم فى الجدار الخلوى، أو أن نشاط IAA كأوكسين يرجع لقدرته على الارتباط ببعض الأيونات وبذلك يتشابه مع المركبات المخلبية. ومعقد Fe(III)-EDTA ثابت عند الرقم الهيدروجينى ٢-٣ لكن بارتفاع الرقم الهيدروجينى عن ذلك (كما هو الحال فى بيئات زراعة الأنسجة) يتحرر بعض الحديد

ويترسب فى صورة معقد مع الفوسفات، ويرتبط المركب المخلبى مع بعض الأيونات الأخرى فتصبح غير ميسرة. وقد توصل Teasdale (1987) إلى أن كل النحاس وأغلب الزنك تقريباً وبعض المنجنيز المضاف إلى البيئة يصبح مرتبطاً بالمركب المخلبى. ولم يكن من الواضح عدم تيسر تلك العناصر فى هذ الحالة إلا أن عدم ظهور أعراض النقص على المزرعة يشير إلى إمكانية امتصاصهما. لكن من الضرورى الإشارة إلى عدم أضافة أكثر من ٠.١ مليمول من EDTA لتجنب أعراض سميتها على بعض النباتات. وقد لاحظ Ohki & Sawaki (1999) زيادة معنوية فى كمية الكلوروفيل الكلى (أ+ب) فى أوراق الأشطاء المتكشفة من زراعة أجزاء من الحامل النورى لنبات *Delphinium cardinale* عند رفع تركيز الحديد فى بيئة MS إلى الضعف مع خفض تركيز الأمونيا وزيادة النترات وذلك للمحافظة على التركيز الكلى للنتروجين المعدنى عند ٦٠ ميكرومول. ويوضح جدول رقم (٢-٧) تأثير تركيز الحديد والأمونيا على كمية الكلوروفيل فى الأوراق.

وللفحم النباتى المستعمل فى مزارع الأنسجة قدرة متباينة على امتصاص بعض المركبات المخلبية المختلفة، لذا أشار Dimassi *et al.* (2003) و Zawadzka & Orlikowska (2006) أن استخدام FeDDHA افضل من FeEDTA. كذلك زرع Salm *et al.* (1994) العقد الساقية لصنف الورد Moneyway الذى يستعمل كأصل للتطعيم فى بيئات MS و Quoirin and Lepoivre (QL) و WP مع استعمال EDTA أو EDDHA فى بيئتى MS و QL كمصدر للحديد. وقد وجد أن EDDHA يساهم فى التغلب على الأصفرار وانخفاض محتوى الكلوروفيل مع زيادة فى طول الأشطاء بالرغم من عدم تاثر الرقم الهيدروجينى حتى بعد ٦ أسابيع من الزراعة. ويرجع Gislerod *et al.* (2005) ذلك إلى حساسية EDTA للضوء فربما تسبب زيادة شدة الإضاءة إلى ظهور أعراض نقص الحديد عند استعمال EDTA بدلاً من EDDHA.

جدول ٢-٧: تأثير تركيز الأمونيا والحديد فى بيئة MS على تركيز الكلوروفيل فى أوراق نبيتات *Delphinium cardinale* الناتجة من الإكثار الدقيق (Ohki & Sawaki, 1999).

تركيز NH_4^+ (مليمول)	تركيز Fe^{3+} (ميكرومول)	كمية الكلوروفيل أ+ب (ميكروجم/جم طازج)
٢٠.٦	٠.١	٦٨٠
١٠.٣	٠.١	٩٨٦
١٠.٣	٠.٢	١٢٢٩
١٣.٧	٠.١	٧٢٥
١٣.٧	٠.٢	١٠٣٢

تشجع EDTA نمو جذور النباتات الناتجة فى زراعة الأنسجة فى الظلام وتفقد الجرعات المنخفضة من EDTA هذا النشاط بإضافة تركيز أيون الحديديك. وفسر ذلك بأن أيون الحديديك يرتبط مع EDTA ليحرر كاتيوناً آخر كان مرتبطاً بها يسبب تثبيط تكوين الجذور. وكما أن التركيزات العالية من EDTA تسبب سمية للنباتات النامية فى المحاليل المغذية فإنها تسبب سميه أيضاً فى مزارع الأنسجة وتقلل من عدد الأشطاء المتكشفة، وقد تثبط تكوين الأشطاء تماماً. وفسر ذلك بأن أيون الحديديك المنفرد من EDTA يسبب ترسيب الفوسفات واصفرار الأوراق والذى يزول بإضافة ٦.٤ مليمول من H_2PO_4.

ثانياً: المواد العضوية

المركبات العضوية هى تلك المحتوية على كربون كالكربوهيدرات، البروتين، الفيتامينات والهرمونات. وهذه المركبات لا تضاف إلى النباتات النامية فى الحقل حيث لها القدرة على تخليقها فى عملية البناء الضوئى أو من نواتجها خلال عمليات الأيض

المختلفة. لكن الأنسجة المنزرعة معملياً والنباتات الناتجة منها إما أنها تكون صغيرة جداً أو غير قادرة على تكوين مستلزماتها من المواد العضوية لعدم توفر الظروف البيئة الضرورية لذلك. وعلى هذا لوحظ تحسن واضح فى النمو والتكشف فى مزارع الأنسجة بإضافة هذه المواد إلى بيئة النمو. وتشمل المواد العضوية المضافة لمزارع الأنسجة كما بينتها العديد من المراجع أهمها Pierik (1987) و Thorpe *et al.* (2008) ما يلى:

أ. الفيتامينات

فى البداية كانت بعض المواد غير محددة التركيب كلبن جوز الهند، وعصير الطماطم، ومستخلص الخميرة، والكازين المتحلل تضاف لمزارع الأنسجة كمصدر للمواد العضوية. وبالطبع تعتبر تلك المواد مصدر كافى لحاجة المزرعة من الفيتامينات، لكن بالإقلال من استخدام هذه المواد والاستعاضة عنها بمركبات ذات نقاوة عالية ظهرت أهمية إضافتها لبيئات النمو. ومن الفيتامينات التى تضاف إلى معظم البيئات thiamin (B1) و nicotinic acid (niacin) وpyridoxine (B6) وكذلك myo-inostol. ولكى يقال أن أحد الفيتامينات ضرورياً لنمو مزارع الأنسجة لابد من التأكد من ذلك بإجراء العديد من الدراسات. وبينت الدراسات أن بعض الفيتامينات التى استعملت فى تركيب البيئات الشائعة يمكن أن تستبعد دون التأثير على النمو. فبالرغم من أن بيئة MS تحتوى على أربعة فيتامينات فإن نمو خلايا كالوسات الدخان لم يتأثر عند استعمال الميوانزيتول والثيامين فقط ولم يكن لحامض النيكوتينك والجليسين والبيرودكس تأثير على النمو. والفيتامينات التى تضاف غالباً إلى مزارع الأنسجة هى:

١. الميونسيتول Myo-inositol

يعتبر الميونسيتول أحد مكونات فيتامين ب وهو عبارة عن سكر كحولى تابع لمجموعة مركبات a-steroisomers وله نشاط حيوى هام لنمو الخميرة وكذلك

الخلايا القديمة فى مزارع الأنسجة النباتية. ويعتقد أنه هام فى تخليق البكتين والهيميسلوليز وبالتالى تخليق الجدر الخلوية. وربما يلعب دوراً فى امتصاص بعض الأيونات، حيث زاد امتصاص الكالس لايونات الفوسفات بزيادة تركيز الفيتامين إلى ٤ جم/لتر. وقد يضاف الميوانسيتول فى بعض البيئات كمصدر للكربوهيدرات. وتتباين حاجة مزارع الأنسجة للميونسيتول على أساس قدرتها على تخليقه، فالأنطاء لها قدرة على تخليقه عكس الأنسجة غير المتكشفة التى لها قدرة بسيطة على النمو دون إضافته للبيئة، ويعتقد البعض أن هذا الفيتامين ضرورى لنمو بعض النباتات خاصة أحادية الفلقة ويعوض نقصه باستعمال لبن جوز الهند أو مستخلص الخميرة. ويضاف الميونسيتول إلى البيئة بكميات كبيرة نسبياً تصل إلى ١٠٠ ملجم/لتر. وقد أشار Vahdati *et al.* (2008) إلى أنه أمكن تحسين النمو وزيادة معدل التجذير حتى ٧٠% لنباتات الجوز *Juglans regia* برفع تركيز الميوانسيتول إلى ضعف تركيزه فى بيئة DKW مع زيادة تركيز النحاس عشر مرات، لكن ارتبط ذلك بالصنف النباتى.

٢. الثيامين Thiamine (B1)

يعتبر الثيامين $C_{12}H_{17}ON_4SC$ من المجموعات الفعالة لبعض إنزيمات دورة كربس، كما يساهم مباشرة فى تكوين بعض الأحماض الأمينية وهو أكثر الفيتامينات استخداماً فى مزارع الأنسجة. وتزيد الحاجة إلى الثيامين بتقدم المزرعة فى العمر أو بإجراء نقل جديد للمزرعة إلى بيئة جديدة حيث يعنى ذلك انخفاض المحتوى الداخلى للنسيج منه. فقد انخفض معدل نمو معلق خلايا الذرة تدريجياً ثم ماتت بعد تجديد الزراعة ثلاث مرات عندما كانت البيئة خالية من الثيامين. وربما يكون للثيامين بعض التأثيرات المشتركة مع السيتوكينينات، فقد وجد أن زيادة تركيز Kinetine تسبب تكوين كمية كافية من الثيامين فى كالوس الدخان لكن بانخفاض تركيز منظم النمو تفشل الخلايا فى النمو والانقسام. وأوضح Barwale *et al.* (1986) أن تركيز الثيامين فى

بيئة MS والذى يبلغ ٠.٣ ميكرومول غير كافى لتكوين الأجنة الجسدية عند زراعة الأجنة الزيجوتية لنبات *Glycine max* وزاد معدل عدد المُستأصَلات النباتية القادرة على تكوين الأجنة الجسدية من ٣٣% إلى ٥٨% عند رفع التركيز إلى ٥ ميكرومول. وزادت تلك النسبة إلى ٧٦% عند اضافة ٤ ميكرومول من حامض النيكوتينك.

٣. حامض النيكوتنك Nicotinic acid

يدخل حامض النيكوتنك كعامل مساعد للإنزيمات المسئولة عن التفاعلات الضوئية ويضاف إلى البيئة بتركيز ٠.١-١٠٠ ملجم/لتر. كما قد تحتوى البيئات أيضاً على البيرودكسين، حامض الفولك، الكولين.

ب. الأحماض العضوية

قد تضاف بعض الأحماض العضوية مثل الستريك، الماليك، السكسنك إلى بيئات مزارع الأنسجة وذلك لأدوارها التالية:

- **دور مخلبى:** توجد بعض الأحماض العضوية الثنائية التكافؤ مثل الستريك والماليك والمالونك فى خشب بعض النباتات حيث تتحد مع بعض الأحماض الأمينية والأيونات لتكون معقد يساعدها على الانتقال فى النبات. كذلك قد تفرز هذه الأحماض فى البيئة وتساعد على تيسر الحديد غير المخلبى فتعالج أعراض نقص الحديد.
- **دور مغذى:** يزداد أيض الأمونيا بإضافة أحماض دورة كربس للبيئة. وقد أمكن بإضافة malic acid و fumaric acid و sodium pyruvate و potassium pyruvate إلى بيئة النمو زراعة بعض الخلايا بكثافة منخفضة عن الكثافة اللازمة فمثلاً يتطلب زراعة المعلق الخلوى حد أدنى من كثافة الخلايا فى البيئة. وقد لا تتحمل الخلايا اضافة التركيزات العالية من الأحماض العضوية التى تسبب زيادة الحموضة فمزارع متك التريتيكال تنمو فى بيئة N6 باضافة ٣٥ ملجم/لتر من بيروفيات الصوديوم وحامض الماليك والفيوماريك، لكن ثبط النمو عند رفع التركيز إلى ١٠٠ ملجم/لتر. ويمكن التغلب على ذلك بإضافة الأحماض العضوية فى صورة أملاح الصوديوم أو البوتاسيوم حيث تعادل الكاتيونات

الأنيونات وبذلك يمكن أضافة كمية كبيرة من الأحماض العضوية دون ظهور أعراض التسمم. ويتراوح تركيز أملاح الصوديوم والبوتاسيوم لهذه الأحماض فى معظم البيئات بين ٣٥ إلى ١٤٠ مليجرام/لتر. وقد شجع Ramming (1990) نمو مزارع أجنة الخوخ بإضافة ٥ مليمول من سكسينات البوتاسيوم لبيئة النمو.

- **تنظيم الرقم الهيدروجينى:** على الرغم من اعتبار الأحماض العضوية ثلاثية الكربوكسيل مصدر للنتروجين العضوى فإنها تعمل بتركزات عالية تصل إلى ١٠٠ ملجم/لتر على ثبات الرقم الهيدروجينى فى مزارع البروتوبلاست لكنها لم تكن فعاله بيولوجيا كالمنظمات الأخرى.

ج . الأحماض الأمينية

ربما تضاف الأحماض الأمينية لبيئة النمو لإستيفاء حاجة المزرعة من النتروجين المختزل، لكن نظراً لارتفاع ثمنها فلا تضاف إلى مزارع الإكثار الدقيق إلا إذا كان هناك تحسين ملحوظ فى معدل النمو والتضاعف. وغالباً لا تضاف تلك الأحماض لمعظم مزارع الأنسجة على أساس أن البيئة تحتوى على التركيز الأمثل من النتروجين بصورتيه. وبينت التجارب الأولية لزراعة الأنسجة على يد موراشيج وسكوج تحسن نمو مزارع كالوس الدخان بصور واضحة بإضافة لبن جوز الهند والكازين المتحلل، وقد أرجع السبب بصورة جزئية إلى الأحماض الأمينية. كذلك أوضحت بعض الأبحاث التأثير الإيجابى للارجنين بتركيز ٠.٢٧٨ مليمول على نمو معلق خلايا قصب السكر. ويتضح من الدراسات التى استخدمت الأحماض الأمينية أن تأثيرها كان فعالاً على النمو والتكشف فى البيئات ذات المحتوى المنخفض من الأمونيا. واشار Grimes & Hodges (1990) إلى أن تأثير الأحماض الأمينية يتوقف على النسبة بين تركيز النترات والأمونيا فى حالة إحتواء البيئة على الصورتين. ويجب الإشارة إلى أن الصورة اليسارية فقط L-isomers أو α- amino من الأحماض الأمينية هى الفعالة حيوياً.

يمكن للأحماض الأمينية أن تمد الخلايا بصورة ميسرة سهلة الامتصاص من النتروجين بالمقارنة مع النتروجين غير العضوى (Thom *et al.*, 1981)، وقد تمتص لتعويض النقص فى الفوسفور. لكن ربما يتبادر إلى الذهن السؤال التالي: إذا كان النتروجين المعدنى المضاف إلى البيئة يتم تحويله فى النبات إلى أحماض أمينية ليدخل فى تخليق البروتين فلماذا لا يضاف النتروجين فى هذه الصورة مباشرة، وبذلك يمكن توفير الطاقة التى تستهلكها الخلية فى تخليق الأحماض الأمينية من الأمونيا؟. وبالفعل استطاع Muller & Grafe (1978) زراعة كالوس الدخان فى بيئة MS الخالية من النتروجين عند زيادة تركيز البوتاسيوم إلى ٢٠.٦ مليمول واضافة أحماض الجليسين والأرجنين والأسبارتك بتركيز ٠.١ و١ و٢ مليمول على التوالى.

لكن يسبب امتصاص الأحماض الأمينية زيادة حموضة البيئة وضرورة وجود محلول منظم للرقم الهيدروجينى أو إعادة ضبطه باستمرار. والسبب الأخر هو اختلاف استجابة النباتات للإحماض الأمينية. وعلى العكس من باقى الأحماض الأمينية يعتبر الجليسين من المركبات المستعملة لتحضير معظم مزارع الأنسجة حيث يضاف بتركيزات متباينة لتدعيم نمو الأشطاء ويصنف أحياناً ضمن الفيتامينات. وبالرغم من الاستعمال الواسع للجليسين كأحد مكونات البيئة يصعب وجود تأكيد قوى لدوره فى البيئة، لكنه قد يحمى الأغشية الخلوية من الإجهاد الاسموزى والحرارة (Orczyk & Malepszy, 1985). وبالرغم أن الأحماض الأمينية ليست ضرورية للنمو فإن الميثونين حالة مختلفة حيث لاحظ Druart (1988) أن اضافة ٥٠-١٠٠ ملجم/لتر من المثيونين يزيد من فاعلية السيتوكينين وبالتالى زاد معدل تضاعف لأشطاء *Prunus glandulosa* وقد فسر ذلك بدور الميثونين كبادئ فى تخليق الإثيلين. ويشير Bister-Miel *et al.* (1985) إلى دور الجلوتامين الإيجابى فى نمو الخلايا بزارعة المعلق الخلوى الذى يعانى من نقص الفوسفات وذلك عندما أضيف الكازين المتحلل للبيئة.

د. السكريات كمصدر للطاقة

الكربوهيدرات مكون هام جداً فى بيئة زراعة الأنسجة كعامل ضرورى للنمو، وذلك لأن ناتج عملية البناء الضونى - إن تمت- يكون غير كافى للنمو فالظروف البيئة غير مواتية لإتمام هذه العملية. لكن فى بعض المزارع اصبحت بعض السلالات الخلوية cell lines ذاتية التغذية أى يمكنها تثبيت ثانى أكسيد الكربون كمصدر للطاقة، وينخفض معدل نمو هذه الخلايا بانخفاض ثانى أكسيد الكربون فى الوسط المحيط الغازى. ونظراً لأهمية ذلك من الناحية الاقتصادية والعملية تعددت الدراسات بهدف دفع الخلايا والنباتات فى مزارع الأنسجة لتصبح ذاتية التغذية. وذلك باستخدام تركيزات مرتفعة من ثانى أكيسد الكربون وكثافة ضوئية عالية مع خفض تركيز أو حذف السكر بالكامل من البيئة (Kozai, 1991). لكن يجب ملاحظة أن السكر يعمل على تثبيط تكوين الكلوروفيل وعملية البناء الضونى جاعلاً نمو الخلايا الذاتية التغذية غير ملحوظ، وسيتم الحديث بالتفصيل عن المزارع ذاتية أو خليطة التغذية الضوئية لاحقاً.

وقد أشار Koch (1996) إلى دور الكربوهيدرات فى تنظيم التعبير الجينى بتنشيط أو تثبيط بعض الجينات. وعلى هذا فمن الضرورى إضافة مصدر كربونى للبيئة، وغالباً يستخدم السكر أو بعض البدائل الأخرى كمصدر للطاقة. ويمتص السكر فى مزارع أنسجة الجزر بطريقة الانتقال السلبى وقد يمتص جزء منه بالانتقال النشط. ولما كان السكر هو المركب الكربوهيدراتى السائد فى عصارة لحاء معظم النباتات فإن معظم البيئات تحتوى عليه كمصدر للطاقة. لكن من الثابت عملياً أن انزيم الانفرتيز المتحرر من بعض الأنسجة المنزرعة معملياً يعمل على تحلل السكر إلى جلوكوز وفركتوز اى أن البيئة تصبح محتوية على الثلاثة أنواع من السكريات (De Klerk & Calamar, 2002). وفى بعض الأشجار خاصة تلك التابعة للعائلة الوردية يعتبر

السوربيتول هو السكر السائد فى اللحاء وعلى هذا يكثر استعمال تلك الأنواع من الكربوهيدرات فى مزارع الأنسجة.

وعموماً يعتبر السكر أنسب مصدر للطاقة يليه الجلوكوز الذى يعطى تأثير مشابة للسكر لكن نظراً لارتفاع سعره فلا يستعمل إلا فى الحالات التى قد يفوق تأثيره فعل السكر كحالات تكشف النباتات، لكن يتوقف ذلك على نوع النبات والمُستأصل المنزرع. فقد وجد Phillips & Hubstenberger (1985) أن التكشف المباشر للأشطاء من الأقراص الورقية لنبات *Capsicum annuum* يتطلب وجود الجلوكوز. ويلى الجلوكوز كمصدر للكربوهيرات المالتوز ثم الرافينوز، أما الفركتوز فأقل تأثيرا من المجموعة السابقة، ويعتبر المانوز واللاكتوز غير مناسبين لزراعة الأنسجة. واستعمل Luo *et al.* (2009) الجلوكوز والسكروز والمالتوز والفركتوز بتركيز يتراوح بين ٥ و٤٠ جم/لتر فى بيئة MS بغرض تكشف الأشطاء من كالس نباتات *Dendrobium huoshanense*.

ووجد أن الفركتوز غير مناسب على الاطلاق لتكوين الأشطاء بينما زاد عدد الأشطاء باستعمال المالتوز خاصةعند تركيز ١٠ جم/لتر ثم السكروز وكان عدد الأشطاء المتكشفة عند استعمال الجلوكوز منخفض جداً. وقد يرجع تفوق المالتوز على السكروز فى هذه الحالة إلى بطء تحلل وامتصاص المالتوز. ويفترض Jheng *et al.* (2006) أن النقص فى السكر المتاح هو المحفز لعملية التكشف فى حين يعتقد Krogstrup *et al.* (2005) أن الدور المحفز للمالتوز ربما يرجع إلى تأثيره على الضغط الأسموزى للبيئة. كذلك درس Shatnawi *et al.* (2006) تأثير مصادر مختلفة للكربون على تكشف ونمو أشطاء نباتات *Pyrus sayriaca* باستعمال بيئة MS، ويبين جدول (٢-٨) أن السكروز شجع تكوين أشطاء عرضية يصل عددها إلى ٦.٨ أما الجلوكوز والفركتوز فقد شجعا نمو البرعم الإبطية فقط.

ويكثر استعمال المالتوز فى مزارع المتك خاصة للنباتات النجيلية فقد استعمل لتسريع انقسام الخلايا وإنتاج الكالس من زراعة الخلايا الأمية للأرز، كما زاد عدد النباتات الخضراء لنباتات الشعير عندما استعمل المالتوز فى مزارع الخلايا الامية. وقد فاق تأثير المالتوز السكر فى إنتاج الأجنة الجسدية للعديد من الأنواع النباتية من مثل الكرز البرى والصنوبر وغيرهما (Reidiboym-Talleux *et al.*, 1999). ورغم الاستعمال الشائع للسكروز فى بيئات الإكثار فإن النتائج السابقة وتلك التى وجدها البعض مثل Krogstrup *et al.* (2005) و Gemas & Bessa (2006) و تشير إلى مدى أهمية دراسة مدى ملاءمة المالتوز لنمو مزارع الأنسجة.أما الجلاكتوز فقد يكون ساماً لبعض المزارع لكنه بتركيز منخفض قد يقلل من ظاهرة التميؤ الزجاجى. وأظهرت بعض الدراسات دوره الايجابى ، حيث يشجع انضاج الأجنة الجسدية (Schuller & Reuther, 1993) وتكوين الجذور على نباتات Annona squamosa فى دراسة *Lemos & Blake* (1996) ربما تستخدم بعض أنواع شراب الذرة المحتوى على جلوكوز ومالتوز والسكريات العديدة كمصدر للكربون حيث أدت إضافته تكشف أعضاء لم تتحقق باستعمال السكر. كذلك ساعد فى تكوين أجنة جسدية من طرز خلايا غير جنينيه لكالوس نباتات الجزر عمرها ٥-١٠ سنوات. وتجدر الإشارة إلى أنه يمكن أن تتحلل بعض السكريات الأحادية كالأرامنوز، الزيلوز، والثنائية كالمالتوز إلى جلوكوز وفركتوز عند اضافتهم للبيئة. وليس من الطبيعى دخول السكريات الكحولية فى عمليات الأيض داخل النبات. لكن قد يستعمل المانيتول وهو سكر خامل والسوربتول لزيادة الضغط الاسموزى للبيئة وفى هذه الحالة لابد من إضافة كمية من السكر لتوفير الطاقة، ومن الجدير بالذكر أن إضافة المانيتول والسوربتول يجعلان البورون غير ميسر.

جدول ٢-٨: تأثير مصادر مختلفة من الكربوهيدرات على نمو نبات *Pyrus sayriaca* فى بيئة MS تحتوى على ١ ملجم/لتر BA و ٠.١ ملجم/لتر IBA (Shatnawi *et al.*, 2006).

مصدر الكربون	التركيز (%)	عدد الأشطاء	طول الأشطاء (مم)	الوزن الطازج (جم)	الوزن الجاف (جم)
سكروز	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠٠٠	٠.٠٠٠
	١.٥	٦.٨	٧٨.٦	٠.٧٠٣	٠.١٣٦
	٣.٠	٤.٦	٦٧.٠	٠.٧٧٤	٠.١٣٩
	٤.٥	٢.٦	٥٣.٠	٠.٣٩٠	٠.١٠٨
	٦.٠	١.٨	٣٩.٤	٠.٢٩٤	٠.٠٧٦
فركتوز	٠.٠	١.٠	١٩.٨	٠.١٥٤	٠.٠١٢
	١.٥	١.٠	٣١.٢	٠.٥١٩	٠.٠٨٩
	٣.٠	١.٠	٢١.٦	٠.٤٣٦	٠.٠٦٧
	٤.٥	١.٠	٢٣.٢	٠.٣٤٩	٠.٠٦٤
	٦.٠	١.٠	١٩.٨	٠.١٢٥	٠.٠٤٤
جلوكوز	٠.٠	١.٢	٣٦.٦	٠.٢٤٥	٠.٠٦٠
	١.٥	١.٢	٣٢.٤	٠.٢٥٥	٠.٠٧٩
	٣.٠	١.٤	٢٨.٠	٠.٣٥٥	٠.٠٣١
	٤.٥	١.٠	٢٤.٠	٠.٢٠٥	٠.٠٦٣
	٦.٠	١.٢	٢٣.٠	٠.١٩١	٠.٠١٦

التحلل المائى للسكر

مما لاشك فيه أن تركيز السكر من العوامل المؤثرة على النمو والتكشف فى مزارع الأنسجة. وقبل أن نستعرض ذلك لابد أن نشير إلى أن جزء من أو كل السكر المضاف للبيئة يتحلل مائيا إلى مكوناته من السكريات الاحادية من الجلوكوز والفرتكوز ويحدث هذا أيضاً للسكر بعد امتصاصه كى يدخل فى عمليات الأيض. ولاحظ Kromer & Kukulczanka (1985) زيادة معدل بقاء القمم الميرستيمية لنباتات *Canna indica* باضافة ٢٥ و ٥ جم/لتر من الجلوكوز والفركتوز على التوالى بدلاً من ٣٠ جم/لتر سكر. لكن لم يكن لتلك السكريات الأحادية نفس الدور المحفز للسكر لتطوير الأجنة الجسدية لنباتات *Pseudotsuga menziesii* طبقاً لملاحظات (Taber *et. al.* 1998). وقد سجل De Reik *et al.* (1997) تحلل السكروز فى البيئة المستعملة لزراعة *Rosa multiflora* فى مرحلتى التضاعف وتكوين الجذور.

وتؤدى عملية التعقيم بالاوتوكلاف إلى التحلل المائى لبعض السكر ويزيد هذا التحلل إذا اضيف السكر إلى باقى محتويات البيئة مقارنة بتعقيم السكر بمفرده. ويؤثر الرقم الهيدروجينى للبيئة على مدى تحلل السكر، حيث يزيد ذلك بانخفاض الرقم الهيدروجينى وقد قدر أن ١٠-١٥% من السكر يتم تحلله مائيا إلى جلوكوز وفركتوز عندما يكون الرقم الهيدروجينى ٥.٥: ٥.٨. وقد وجد أن الخلايا تنمو بدرجة أحسن فى بيئة معقمة بالأوتوكلاف بالمقارنة مع تلك المعقمة بالمرشحات وأرجع ذلك للتحلل المائى للسكر (Thorpe *et al.*, 2008).

لكن من الصعب الإجابة على سؤال هل التعقيم بالأوتوكلاف مرغوب ام لا لبيئة مزارع الأنسجة؟ لتعارض الكثير من الأبحاث حول ذلك، ويبدو أن للطرز الوراثية دوراً فى تلك الاستجابة. وبالإضافة إلى التحلل المائى للسكر يتم أيضاً تكسيره إلى سكريات أحادية كالجلوكوز والفركتوز أثناء الزراعة ببعض الإنزيمات مثل الانفرتيز

الموجود فى الجدر الخلوية أو بالإنزيمات المتحررة من الخلايا ويتوقف ذلك على النوع النباتى. وقد وجد (Zamski & Wyse, 1985) أن كل السكر المضاف إلى بيئة قصب السكر يتحلل مائياً خلال ثلاثة أيام. كما أن لدرجة حرارة المزرعة تأثير على تحلل السكر المضاف فقد تأثر نمو جذور الطماطم المنزرعة فى البيئة بتركيز السكر، لكن ارتبطت الاستجابة بدرجة حرارة البيئة. حيث أدى تغير درجة الحرارة عن ٢٨°م إلى التأثير على نشاط إنزيم الإنفرتيز الذى أثر بدوره على معدل النمو. لكن أدى انخفاض درجة الحرارة إلى انخفاض معدل النمو على الرغم من أن نشاط الإنزيم ظل عالياً.

تأثير السكر على مزارع الأنسجة

اهتمت العديد من الأبحاث بتقدير التركيز المناسب للسكر فى مزارع الأنسجة خاصة فيما يتعلق بنمو الأفرع والأجنة الجسدية، ولم يكن هناك اهتمام كبير بدراسة تأثيره على الأنسجة غير المتكشفة. وبالطبع فإن التركيز الأمثل لنمو الكالس ليس هو نفسه المناسب لنمو الأفرع المتكشفة. ويتوقف هذا التركيز على عوامل منها النوع النباتى، الجزء المنزرع، عمر المزرعة، باقى مكونات البيئة، فقد يسبب التركيز المرتفع نسبياً بنسبة تصل إلى ٤.٥% ظهور أعراض التميؤ الزجاجى فى بعض النباتات كالقرنفل بينما يشجع النمو والتكشف فى نباتات أخرى (Ziv, 1991). وقد لا تزيد استفادة المزرعة من زيادة تركيز المكونات الغذائية للبيئة إلا إذا زاد تركيز السكر، فمثلاً لا يتضح تأثير التركيز المرتفع من النتروجين فى عملية التكشف إن لم تحتوى البيئة على تركيز مناسب من السكر. وقد تأثر امتصاص مزارع نبات Dendrobium للنترات والأمونيا من البيئة بتركيز ونوع السكر المضاف. وقد لا يكون التركيز المناسب لإبقاء الأجزاء المنزرعة حية وتكوين الأشطاء مناسباً لتكوين الجذور على النباتات المتكشفة، ففى تجربة لإكثار نباتات *Lilium longiflorum* باستعمال أجزاء من الساق كان تركيز ٣-٤% من السكر فعال جداً فى تكشف البراعم لكن لم تتكون جذور على النباتات المتكشفة حتى بعد ٩٠ يوما من الزراعة. لكن بخفض

التركيز إلى ٢% كان عدد الأشطاء المتكون أقل قليلا كما يبين جدول رقم (٢-٩) لكن تم استحثاث عملية التجذير بعد ٦٠ يوم من الزراعة. ويتضح من الجدول مدى تأثير السكر على نجاح مرحلة تأسيس المزرعة.

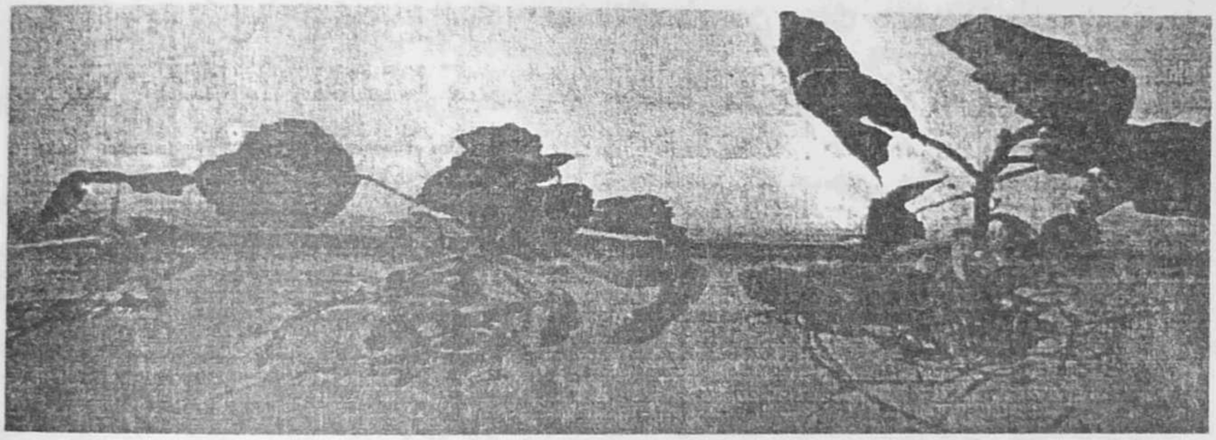
وفى دراسة على نمو البراعم العرضية وتجذير افرع *Ficus carrica* يبين شكل رقم (٢-٣) تأثر النمو الخضرى وطول وعدد الجذور بعد ثلاثة اشهر من زراعة العقل الساقية فى بيئة MS تحتوى على صفر و ١٥ و٣٠ جم/لتر. وفى دراسة قام بها Carelli & Echeverrigaray (2002) لإكثار صنف الورد Baronesse بالبراعم الجانبية استعمل المانيتول والسربيتول والجلاكتوز والجلوكوز كمصدر للسكر.

ووجد أن الجلوكوز والسكر هما الأفضل من حيث عدد الأشطاء المتكشفة وطول الأشطاء. وعلى الرغم من عدم وجود اختلافات بين تأثير التركيزات المختلفة من السكر فإن أفضلها كان ٣% لتلافى ظاهرة التميؤ الزجاجى. وقد أشار Langford & Wainwright (1987) إلى أن خفض تركيز السكر فى بيئة النمو يزيد من معدل التضاعف للورد. أما من ناحية تأثير تركيز السكر على تكوين الأجنة الجسدية فقد أدت زيادة التركيز من ٣ إلى ٦% إلى زيادة معنوية فى عدد الأجنة المتكونة ليصبح ٦ لكل مستأصل نباتى من السويقة الجنينية العليا لنباتات *Pelargnonium zonal* وبصورة عامة يؤثر السكر على التكشف فى:

١. **تكوين الحزم الوعائية:** تساهم السكريات بوضوح فى تكشف عناصر الخشب واللحاء فى خلايا مزارع الأنسجة المنزرعة فوجود السكر ضرورى لتكوين قصيبات الخشب tracheid. واتضح من بعض التجارب أن عدد الأنابيب الغربالية والخشب المتكون ونسبة كل منهما إلى الأخر تتوقف على تركيز السكر. إلا أنه ليس من الواضح تماما ما إذا كانت السكريات تقوم بدور أخر غير كونها مصدر للطاقة اللازمة لعمليات الأيض النباتى الضرورية للتكشف.

جدول ٢-٩: تأثير تركيز السكر فى الحفاظ على حياة المُستأصَلات النباتية المنزرعة وتكشف الجذور على النباتات المتكشفة من نبات *Lilium longiflorum*. بعد شهرين من الزراعة (Azadi & Khosh-Khui, 2007).

السكر (%)	عدد الأيام من الزراعة	عدد لجذور/ النبات	المُستأصَلات النباتية التى استمرت حية (%)
١	٦٠	١٢.٢	٤٠
٢	٦٠	٢.٥	٩٥
٣	٧٥	٩.٨.	١٠٠
٤	٩٠	١.٧.	١٠٠



شكل ٢-٣: نمو وتجذير العقل الساقية لنباتات *F. carrica* فى بيئة MS تحتوى على تركيز ٣٠ و ١٥ و صفر جم/لتر من السكر (من اليمين إلى اليسار على التوالى، وذلك بعد شهرين من الزراعة).

٢. تكوين الكلوروفيل: يعتبر تركيز السكر المشجع للنمو فى مزارع الأنسجة مثبطاً لتكوين الكلوروفيل لكن هذا التركيز المثبط يختلف باختلاف الأنواع النباتية، فبعض الأنواع لها القدرة على تخليق الكلوروفيل عندما يكون تركيز السكر فى البيئة صفر. وقد أُرجع ذلك إلى أن السكر يعمل على تثبيط الأنزيم المخلق لـ 5-aminolaevulinic acid (ALA) وهو بادئ لتكوين جزئيات Porphyrin الداخلة فى تكوين الكلوروفيل. وبزيادة مدة نمو المزرعة فى وجود السكر تفقد الخلايا قدرتها على تكوين الكلوروفيل

وتمتلئ البلاستيدات بالنشا ويتغير محتواها من الأحماض النووية RNA وDNA، وقد تكون بعض الأشطاء النامية فى مزارع الأنسجة قادرة على القيام ببعض النشاط الضوئى وعملية البناء بشرط أن يكون تركيز السكر منخفض.

٣. تراكم النشا والتكشف: يتراكم النشا غالباً فى بلاستيدات خلايا الكالس وكذلك فى معلق الخلايا خصوصا فى مرحلة الثبات من منحنى النمو. ولما كانت عملية التكشف تحتاج إلى طاقة فإن النشا يتم تحلله فى مرحلة التكشف، وينخفض تركيزه وتزيد سرعة عملية التنفس فى مزارع الأشطاء عن الكالس أى أن السكر من متطلبات عملية التكشف (Thorpe *et al.*, 1986)و (Azadi & Khosh-Khui, 2007). ولوحظ تراكم النشا الذى مصدره السكر فى خلايا الدخان فى بعض المواقع التى تتكشف فيما بعد إلى أشطاء. وعلى هذا يُقترح أن عملية تراكم النشا من متطلبات حدوث التكشف حيث يعمل كمصدر للطاقة اللازمة لتكشف القمم الميرستيمية والأشطاء. لكن لا يتم تراكم النشا قبل التكشف فى بعض الأنواع النباتية (Von Arnold, 1987)، والاكثر من ذلك قد يؤدى تراكم النشا فى بعض النباتات إلى تثبيط التكشف. مثلاً لوحظ أن خلايا البرسيم الحجازى المنتخبة لتحمل الملوحة تفقد قدرتها على التكشف بعد زراعتها لمدة ثلاث سنوات فى بيئة تحتوى ٣% سكر، وبنقل الخلايا إلى بيئة تحتوى على ١% سكر وتركيز عالى من 2,4-D لمدة ٢٤ يوم انخفض تركيز النشا وتكشفت الأشطاء (Rains *et al.*, 1980).

هـ .المواد العضوية غير محددة التركيب

قبل استخدام الكيماويات عالية النقاوة كانت بيئات مزارع الأنسجة تتضمن بعض المركبات غير محددة التركيب والتى تمتاز بإحتوائها على عدداً من المواد المختلفة والتى يختلف تركيزها من مستحضر لآخر. ومن هذه المواد التى أثبتت فاعلية فى مزارع الأنسجة لبن جوز الهند، الكازين المتحلل، مستخلص الخميرة، عصير

البرتقال. وتحتوى هذه المواد على عناصر غذائية، هرمونات، فيتامينات، أحماض عضوية وأمينية. فعلى سبيل المثال عند تحلل بروتين الكازين بالأحماض أو بالإنزيمات تتكون العديد من الوحدات الصغيرة عبارة عن خليط من الأحماض الأمينية يصل عددها إلى ١٨ حامض والسلاسل الببتيدية مختلفة الأطوال والفيتامينات التى يمكن أن تمتص بواسطة الأنسجة النباتية كمصدر للعناصر المعدنية مثل الكالسيوم والفوسفات (Thorpe *et al.*, 2008). وأشار أيضاً إلى اعتبار الكازين المتحلل مصدراً جيدا لحامض الجلوتامين عند نقصه فى البيئة بسبب عدم كفاية محتواها من الفوسفات. وقد سجل (Suezawa *et al.*, 1988) تحسين فى معدل نمو معلق خلايا نباتات *Actinida chinensis* بإضافة ٥ مليمول من الجلوتامين. وبالطبع فإن استعمال الكازين المتحلل يكون أفضل من إضافة الأحماض الأمينية الناتجة من تحلله لاحتواءه على العديد من المركبات الأخرى كما سبق الذكر. لكن رغم ذلك يندر استخدام هذه المواد فى مزارع الأنسجة الآن لأنها غير نقية تماما ويتغير تركيبها تبعاً للمصدر وطريقة التحلل.

ثالثاً: المواد المصلبة للبيئة

يمكن أن تنمو الأنسجة النباتية فى بيئة سائلة بشرط توفير الأكسجين الضرورى للنمو وبدون الحاجة إلى سطح صلب لتدعيم النمو فى أغراض معينة. وربما تنمو الأشطاء عند استعمال طبقة رقيقة من البيئة السائلة دون الحاجة إلى تهوية. فقد أمكن الحصول على عدد هائل من أشطاء *Ruta graveolens* يصل وزنها الطازج إلى ١٠٠ جم خلال شهر من زراعة ٢ جم من الأشطاء حديثة التكشف فى ٢٠ مل من بيئة MS على أن تجدد البيئة كل أسبوع (شكل رقم٢-٤).

لكن هناك بعض المميزات التى تتطلب وجود سطح شبه صلب لتدعيم النمو، أو استعمال الوسط الصلب والسائل معا والتى سيتم مناقشتها فى الباب الرابع من هذا الكتاب. وفى البداية حاول البعض تدعيم نمو الكالس والأفرع على ورق سلوفان، وورق

ترشيح، وأنسجة قماش، وكرات من الزجاج، ثم استخدمت مواد تعمل على تصلب البيئة فتدعم النمو دون إعاقة نمو الجذور. ولابد أن تكون المواد المستعملة قابلة للتعقيم وأن تظل البيئة سائلة وهى ساخنة حتى يمكن صبها لتتجمد بعد التبريد. وهناك العديد من المواد التى يمكن استعمالها لهذا الغرض لكن يتوقف ذلك على العامل الاقتصادى والهدف من الزراعة فعلى الرغم أن الآجاروز غالى الثمن جداً إلا أنه أفضل تلك المواد لزراعة البروتوبلاست ومن هذه المواد ما يلى:



شكل ٢-٤: الأشطاء المتكشفة من زراعة أوراق نباتات *Ruta Graveolens* فى بيئة سائلة وبدون الحاجة لنظام تهوية أو رج.

١. الآجار Agar

وهو منتج طبيعى يتكون من خليط من الكربوهيدرات المشتملة على عديد من السكريات البسيطة ويتم استخلاصه من عدة أنواع من الطحالب الحمراء التابعة لأجناس Gelidium و Gracillaria و Perocladia النامية فى مياه البحار، لكن يلزم تنقيته بعناية حتى لا يحتوى على مواد سامة. ويعتبر الآجار من الناحية الغذائية خاملاً لكنه قد يحتوى على بعض الآثار من العناصر المغذية، والتى تختلف نسبتها تبعاً لنوع الطحالب ومكان نموها وفترة جمعها وطريقة الاستخلاص. كما تختلف نسبة الشوائب باختلاف نوع الآجار، ويوضح جدول رقم (٢-١٠) تركيز الشوائب فى بعض أنواع

الآجار شائعة الاستخدام في زراعة الأنسجة. هذا بالإضافة إلى إشارة المنتج إلى وجود بعض الشوائب الأخرى مثل الماغنسيوم، والمنجنيز، والكادميوم، والنحاس، والكروم، والحديد، والرصاص، والنيكل، والسلفات وغيرها حيث تحتوى الأنواع الردئية على مواد فينولية وربما بعض السلاسل الطويلة للأحماض الدهنية. وقد يصل معدل بعض هذه الشوائب إلى أكثر من ٢٠% من تركيزها في بيئة MS.

ويعتبر عدم احتواء الآجار على مواد سامة مثبطة للنمو محل شك. ونظرا لارتفاع الوزن الجزئي للآجار فإن له قدرة عالية على تصلب البيئة لارتباطه الشديد بجزيئات الماء. كما أنه يمتص بعض المركبات من مكونات البيئة والمركبات الأخرى الناتجة من عمليات الأيض النباتي. وإذا زاد تركيز الآجار عن ١٠% يكون من الصعب على النبات امتصاص المحلول المغذى من البيئة، حيث تكون قوة ارتباط الماء بالآجار أعلى من قدرة النسيج على الامتصاص. أما التركيز الأمثل فهو يضمن تدعيم الأنسجة المنزرعة والنباتات وتحرك المحلول من البيئة للنسيج أو النباتات المنزرعة.

جدول ٢-١٠: النسبة المئوية للشوائب ببعض أنواع الآجار المستعملة في زراعة الأنسجة (Pierik, 1987).

الشوائب	نوع الآجار		
	Purified-Agar	Noble-Agar	Bacto-Agar
رماد	١.٧٥	٢.٦٠	٤.٥٠
كالسيوم	٠.٢٧	٠.٢٣	٠.١٣
باريوم	٠.٠١	٠.٠١	٠.٠١
سليكا	٠.٩٠	٠.٢٦	٠.١٩
كلوريد	٠.١٣	٠.١٨	٠.٤٣
سلفات	١.٣٢	١.٩٠	٠.٥٤
نتروجين	٠.١٤	٠.١٠	٠.١٧

ومن الثابت أن الآجار يدمص بعض العناصر على سطحه لكن ليس من المؤكد حتى الآن ما إذا كان لذلك تأثير على استجابة المُستأصَل النباتى أم لا (Leifert *et al.*, 1995). وغالباً يستعمل الآجار المعروف Difico Bacto agar بتركيز ٠.٦-٠.٨%، كما يكثر استعمال أنواع أخرى مثل Gibco Phytagar و Flow agar وSigma، لكن ينصح باستعمال الآجاروز بدلاً من الآجار عند زراعة البروتوبلاست. ومن مميزات الآجار كمصلب للبيئة:

١. تتصلب البيئة المحتوية على الآجار عند أقل من ٤٥° م وتتحول إلى الحالة السائلة برفع الحرارة مرة أخرى إلى ١٠٠° م تقريباً.

٢. لا يتم تحلله بالإنزيمات المفرزة من النبات.

٣. نادراً ما يتفاعل مع باقى مكونات البيئة.

ويختلف تأثير الآجار باختلاف نوعه فقد وجدت فروق ميكروسكوبية فى تكشف قصيبات الخشب لكالوس الخس باختلاف نوع الآجار، لكن لم يكن هناك فرق فى عدد القصيبات المتكشفة عند استعمال Flow agar أو Gibco Phytagar أما عند استعمال النوع KC-TC زاد عدد القصيبات المتكونة. وكان هناك نقص فى عدد القصيبات باستعمال الآجاروز FMC. وقارن Scholten & Pierik (1998) تأثير سبعة أنواع من الآجار على الإكثار الدقيق لأحد هجن الورد *Rosa hybrida* باستعمال العقد الساقية وتوضح النتائج بجدول رقم (٢-١١) الفروق المعنوية فى وزن وطول الأفرع وكذلك عدد ووزن الجذور المتكشفة. وبالرغم من أن النوع BD purified أنتج أعلى وزن من الأشطاء مقارنة مع باقى الأنواع إلا أن وزن وعدد الجذور كان أقل مقارنة مع باقى الأنواع المختبرة. كما اختلفت حساسية الأنواع لنوع الآجار باختلاف مراحل النمو والتكشف (جدول رقم٢-١٢). ويستعمل الآجار غالباً بتركيز ٦-٨ جم/لتر حسب نوعه الآجار المستخدم، وهذا التركيز يضمن صلابة البيئة والاتصال الجيد بين

المُستأصل النباتى والبيئة. وبذلك يمكن تناول الأوعية المحتوية على هذا التركيز والمستعملة للزراعة دون ملاحظة سيولة البيئة، ووضع الأنسجة النباتية على سطحها دون أن تغوص فيها مع ضمان غرسها برفق لنضمن تلامس جيد بين المُستأصل النباتى والبيئة. وعند إضافة الأجار بتركيز ١٠ جم/لتر تكون البيئة شديدة الصلابة ويصعب وضع النسيج عليها وبزيادة صلابة البيئة يثبط نمو الكالس لكن قد يحفز ذلك التكشف لزيادة الجهد الاسموزى للبيئة، وربما يقلل زيادة تركيز الأجار حتى ١٢% من مشكلة التميز الزجاجى.

وبالإضافة إلى تأثير تركيز الأجار على صلابة البيئة فإن البيئة التى تحتوى علي تركيز أقل من الأملاح تكون أكثر صلابة من تلك المحتوية على تركيز أعلى (Ziv, 1991). كما يؤدى انخفاض الرقم الهيدروجينى إلى ٤.٥ لجعل البيئة أقل صلابة.

جدول ٢-١١: تأثير استعمال سبعة أنواع من الأجار على نمو الأشطاء والجذور من العقد الساقية لصنف الورد Motrea كما سجلها Scholten & Pierik (1998).

نوع الأجار	الجذور		الأشطاء	
	العدد	الوزن (ملجم)	الوزن (ملجم)	الطول (ملم)
Merck1614	٦.٢	٣٥	٩٠	٤١
Daishin (Brunschwig Chemie, Netherlands)	٧.١	٢٥	١٨	٦٠
Difco Bacto	٧.٩	٣٠	١٣٥	٨٩
MC29 (Lab M, UK)	١١.٢	٣٩	١٣١	٨٢
BD (Becton Dickinson) grade A	٦.٩	٢٤	٩٧	٧٤
BD granulated	٥.٢	١٨	١٢٩	٨٤
BD purified	١.٧	١١	٢١٣	١٢٢

ومن الصفات الطبيعية الهامة التى تتصف بها البيئة المضاف إليها الآجار، تقليل معدل انتشار الجزئيات المختلفة حيث يعاق انتشار الجزيئات كبيرة الحجم نتيجة تصلب الآجار ويقل الجهد المائى وتزيد لزوجة البيئة. ويعتقد أن هذا يعمل على تراكم نواتج عمليات الأيض السامة فى الأنسجة المنزرعة، ويقلل تيسر مكونات البيئة المختلفة كالأيونات والهرمونات والعناصر الغذائية والمكونات الأخرى، لتناسب ذلك مع حركة الماء من البيئة إلى النسيج. علاوة على أن المُستأصَل النباتى فى البيئة السائلة يكون كله متصل بالبيئة أما فى حاله البيئة الصلبة فإن نصف النسيج المنزرع فقط أو أقل من النصف يكون متصلاً بالبيئة، ويتمكن الجزء العلوى فقط من النسيج المنزرع من الحصول على الأكسجين.

ومن البديهى أن الضغط الاسموزى للأنسجة المنزرعة فى بيئة صلبة اقل من تلك المنزرعة فى وسط سائل، ليمكنها من امتصاص الماء من البيئة. ويلاحظ أن البرولين يتراكم فى الخلايا المنزرعة فى بيئة متصلبة مما يشجع التكشف فى بعض الحالات. أما من الناحية الاقتصادية فإن الآجار يعتبر من المكونات مرتفعة الثمن والتى تسبب زيادة تكاليف البيئة وبالتالى الإكثار الدقيق. ويوضح Jain & Barbbar (2002) فى جدول رقم (٢-١٣) مقارنة بين تكاليف استعمال الآجار وبعض البدائل الأخرى، ويتبين من هذه المقارنة أهمية دراسة تاثير تلك البدائل على إكثار النباتات المختلفة خاصة فى المجال التجارى.

٢. الآجاروز Agarose

يصنع الآجاروز من الآجار، فهو عبارة عن مواد عديدة التسكر. ويندر استعماله فى مزارع الأنسجة نظراً لسعره المرتفع ويرجع ذلك إلى عملية تنقيته. لكنه يعطى قوام هلامى أكثر صلابة من الآجار ولذا يستعمل بتركيز منخفض فى حدود ٠.٤%. ومن الناحية العملية لا يستعمل فى زراعة الأنسجة إلا فى حالات قليلة كزراعة البرونوبلاست والمتوك. ويمتاز الآجاروز بتجمده عند درجات حرارة منخفضة ٣٠°م

تقريباً مما يجعله افضل لزراعة البروتوبلاست بالمقارنة مع البيئة السائلة Bolandi *et al.* (1999). حيث يتم وضع معلق البروتوبلاست فى طبق بترى فى شكل قطرات حجمها ٥٠ ميكروليتر ثم تصب طبقة رقيقة من البيئة فوقها، وبهذه الطريقة يمكن زراعة البروتوبلاست بكثافة منخفضة.

جدول ٢-١٢: حساسية عدة أنواع نباتية للآجار أثناء الإكثار الدقيق (Scholten & Pierik, 1998).

النبات	المُستأصَل النباتى	الاستجابة[1]	الحساسية[2]
Allium porrum Strata	الساق القرصية	axc	+abd
Brassica oleracea var. \`Sierra'	السويقة الجنينية العليا	ads	+ad
Gerbera jamesonii \` Joyce'	الساق	axs	-c
Hippeastrum hybrid \`Cinderella'	الساق الزهرية	abd	+c
Hyacinthus orientalis \`Pink Pearl'	الأوراق الحرشفية	abd	+c
Linum usitatissimum \`Regina'	السويقة الجنينية العليا	ads	+abc
Lycopersicom esculentum \`Counter	السويقة الجنينية العليا	ads	+ad
Lycopersicom esculentum \`Counter	السويقة الجنينية السفلى	adr	-bc
Nephrolepis exaltata \`Teddy Junior'	الأفرع	axs	-c
Petunia hybrida \`Parade'	الأوراق الفلقية	ads	-ad

(١) ads: أشطاء عرضية، adb: بصيلات عرضية، adr: جذور عرضية، axs: أفرع جانبية.
(٢) +:حساس، -: غير حساس، a: الطول، b:الوزن، c: عدد الأشطاء/الجذور/البصيلات حديثة التكوين، d % للتكشف.

٣. الجل رايت Gelrite

يوجد الجل رايت تحت أسماء تجارية مختلفة مثل الفيتا جل ويعتبر من مواد التصلب عالية النقاوة وهو يتكون من مواد مختلفة عديدة التسكر ويتم استخلاصه من بكتريا *Pseudomonas eleodeo* حيث تمثل تلك السكريات تركيب الكبسولة الخارجية. وتحتوى الأنواع التجارية منه على شوائب البوتاسيوم، الصوديوم، الكالسيوم، الماغنسيوم، ولكن لا يحتوى على الشوائب العضوية الموجودة فى الآجار. وعند تسخين ٠.١% من الجل رايت على درجة حرارة ٣٠-٣٥°م فى وجود أيونات البوتاسيوم أو الكالسيوم أو الماغنسيوم فإن الوسط يتصلب. ويستعمل الجل رايت بتركيز أقل من تركيز الآجار (غالباً لا يتعدى ٠.٢%)، حيث يعطى هذا التركيز قوام مشابة لتركيز ٠.٧% من الآجار. وامتصاص الجل رايت للماء أقل من الآجار لذا فإن انتشار الماء والمواد الذائبة فى البيئة أفضل علاوة على شفافية البيئة مقارنة مع الآجار مما يجعل الكشف عن التلوث الميكروبى أسهل. وتشير الشركات المنتجة إلى عدم احتواء الجل رايت على مواد سامة كالمركبات عديدة الفينول. ونظراً لرخص ثمن الجل رايت ونجاح استخدامه فى عدة أنواع من مزارع الأنسجة ولأغراض مختلفة فإنه قد يحل محل الآجار فى زراعة الأنسجة (George, 1993). وقد أدى استعمال خليط من الجل رايت إلى التغلب على ظاهرة التميؤ الزجاجى الشائعة فى زراعة أنسجة بعض الأشجار.

٤. الألجينيت Alginate

يستخلص الألجينيت من حامض Alginic وهو عبارة عن heteropolymer يخلق فى أجناس مختلفة من الطحالب البنية. وتم استخدامه بنجاح فى زراعة البروتوبلاست بديلاً عن الأجاروز حيث يتم التصلب بإضافة أيونات الكالسيوم، ويكون القوام الهلامى المتكون ثابت تحت درجة الحرارة العادية مما يتيح خلط البروتوبلاست مع البيئة. ويفضل استعمال الألجينيت عن الآجار لأن الآجار يتجمد على

جدول ٢-١٣: مقارنة تكاليف بعض المواد المصلبة للبيئة المستعملة فى زراعة الأنسجة (Jain & Barbbar, 2002).

المادة المصلبة	التركيز المستعمل %	التكاليف/لترمن البيئة (US$)
Agar (Difico-bacto)	٠.٨	٣.٨٧
Agar (bacteriological grade)	٠.٩	٠.٣٣
Agarose (Sigma)	٠.٤	٧.١٧
Alginate (Sodium salt, Sigma)	٢.٠-٠.٥	٣.٢٦ (%٢)
Carrageenan (Sigma)	١.٠	٢.٣٩
Starch (Tapioca)	١٠.٠	٠.٠٠٣
Isubgol (Maashal brand)	٣.٠	٠.١٥
Gum-Katira	٣.٠	٠.١٩
Gelrite (gellan gum)	٠.٣-٠.٤	٠.٧١ (%٠.٤)
Ficoll (Sigma)	١٠-٤٠	(%٤٠) ٣٧.٨٧

على درجة حرارة ٤٥° م. ويمكن إذابة القوام الهلامى المتكون بإضافة اسيتات الصوديوم وبذلك يتحرر البروتوبلاست. أما عيوب استعمال الألجينيت فتتمثل فى تأثره بالتعقيم الحرارى وتكسير جزء كبير منه لذا يعقم على ٩٠°م ولمدة ٢٠ دقيقة فقط. والمشكلة الأخرى التى تعيق من استعمال الألجينيت هى تفاعله مع الكاتيونات المتأينة مما يقلل من تيسرها فى البيئة.

٥. النشا

يعتبر النشا من أرخص المواد المستعملة فى تصلب البيئة لكن ليس من المتوقع أن يصبح بديلاً للآجار، ويرجع ذلك إلى ضعف صلابة القوام الهلامى المتكون وكونه غير رائق مما يعيق اكتشاف تلوث المزرعة بالبكتيريا. أضف إلى ذلك إمكانية تحلله بالإنزيمات المخلقة فى الأنسجة المنزرعة، علاوة على ذلك لوحظ أن صلابة القوام الهلامى المتكون تقل بعد التحضير حتى بدون تحضين أنسجة على البيئة. ومن الناحية العملية يتم مزج النشا مع أحجام صغيرة من البيئة أي ما يعادل ١٠% تقريباً من حجمها على درجة الحرارة العادية ثم تضاف هذه الكمية إلى باقى البيئة على درجة الغليان ويتم الخلط والصب بسرعة قبل التجمد. وأثناء التعقيم يتحلل جزء من النشا إلى سكريات يكون لها بالطبع تأثير على استجابة النسيج. فقد وجد أن معدل تكوين النباتات من متك الشعير المنزرع فى بيئة تحتوى ٥% من نشا الذرة أعلى من تلك المتكونة فى بيئة تحتوى على آجار. وعندما استخدم النشا بدلاً من الآجار لتصلب البيئة المستخدمة لزراعة أجزاء من درنات البطاطس تكشفت الأفرع بعد ٣ أسابيع فقط فى حين حدث التكشف بعد ٥-١٤ أسبوع باستخدام الآجار.

ولما كان النشا يكون سطحاً قليل الصلابة فإنه يفضل أن يغطى بطبقة من البولى استر حتى لا يغوص الجزء المنزرع به أو يتم إضافة نسب من مواد مصلبة أخرى كالآجار، الجيل رايت أو الصمغ العربى. ويستعمل النشا عادة بتركيز ٧% أو أعلى حتى يعطى سطحاً ثابتاً وقد يصل التركيز إلى ١٢%، وقد استعمل هذا التركيز فى زراعة القمم النامية لنباتات *Nephrolrpis exaltata* لكنه غير مستحب. واستطاع Kodym & Zapata (2001) أن يستبدلا الجل رايت بخليط منه مع النشا ومن البدائل الأخرى الدقيق ودقيق الساموليناً ونشا البطاطس ودقيق الأرز. وضح Prakash *et al.* (2003) فى جدول رقم (٢-١٤) أن خليط من بدائل الآجار كان أفضل من الآجار فى إكثار *Zingiber officinale*. كما أن استعمال خليط نشا الذرة بتركيزات منخفضة (٥٠

جم/لتر) مع الجل رايت (٠.٥ جم/لتر) فى بيئة إكثار اشجار التفاح والموز وكذلك قصب السكر أفضل من استعمال الآجار. لكن كان من الصعب اكتشاف تلوث البيئة نظراً لأن لون البيئة يميل إلى اللون الرمادى. ومن مميزات استعمال البدائل المشار إليها خفض تكاليف البيئة بنسبة عالية لكن قد تسبب هذه المكونات تثبيطاً للنمو (Powell & Uhrig, 1987).

قام Naik & Sarkar (2001) باستعمال أحد منتجات النشا يطلق عليها Sago وهو منتج غذائى يصنع من أحد أنواع النخيل المسمى بهذا الاسم، أو من مصادر أخرى مثل نشا الأرز أو الذرة أو البطاطس ولكن هناك فروق فى درجة الشفافية لهذا المنتج حسب مصدر النشا المستعمل. وقام الباحثان باستعماله كمادة مصلبة للبيئة المستعملة لإكثار عدد من الطرز الوراثية للبطاطس أو لحفظ النباتات الناتجة عند الحد الأدنى للنمو. ولم تكن التركيزات الأقل من ٨٠ جم/لتر فعالة لإعطاء درجة التصلب المناسبة للبيئة أى التى تمنع غوص الأجزاء المنزرعة. وتشير النتائج الموضحة فى جدول رقم (٢-١٥) إلى عدم وجود فروق بين استعمال الآجار أو الساجو فى معظم الصفات فى مرحلة الإكثار مع وجود تداخل بين نوع مادة التصلب والطرز الوراثية. وكان هناك ميزة فى استعمال الساجو بالمقارنة مع الآجار فى حالة كون الهدف إبطاء النمو للحد الأدنى بسبب زيادة الضغط الاسموزى للبيئة بسبب تحلل جزء منه إلى سكر أثناء التعقيم. ولعل الميزة الواضحة من استعمال النشا والساجو هو عدم نقص درجة التصلب حتى بعد شهرين من الزراعة. كما أن تكاليف استعمال الساجو منخفضة جداً بالمقارنة بالآجار حيث يبلغ ثمن الكيلوجرام حوالى ٠.٣٥ دولار امريكى.

ولاحظ Mohamed & Alsadon (2010a) نجاح إكثار نباتات البطاطس بالعقل الساقية باستعمال النشا التجارى للبطاطس أو الذرة بدون تأثير على ارتفاع النباتات مع زيادة عدد الأفرع عند استعمال ١جم/لتر من الآجار و٥٠ أو ٦٠ جم/لتر

من النشا. وقد انخفض الرقم الهيدروجينى للبينات التى استعمل فيها النشا بتركيز ٥٠ أو ٦٠ جم/لتر من النشا. وقد انخفض الرقم الهيدروجينى للبيئات التى استعمل فيها النشا بتركيز ٥٠ أو ٦٠ جم/لتر، لزيادة قدرة النباتات على امتصاص الأيونات من البيئة نظراً لعدم تغيير مواصفتها الطبيعية وصاحب ذلك ارتفاع فى توصيلها الكهربى .

جدول ٢-١٤: تأثير بدائل الآجار على تصلب البيئات المستعملة فى زراعة أنسجة *Zingiber officinale* كما وجدها Naik & Sarkar (2001).

المكون	جودة التصلب والنمو بالمقارنة مع الآجار
٨% دقيق القمح	تصلب فقير للبيئة، وضعف النمو
١٠% دقيق القمح	تصلب مناسب، لكن النمو اقل من المعدل
٦% نشا	تصلب مناسب ونمو مشابة للنمو العادى
٧% ساموليتا	تصلب مناسب ونمو مشابة للنمو العادى
٧% دقيق البطاطس	تصلب مناسب ونمو مشابة للنمو العادى
١١% دقيق الارز	تصلب مناسب، لكن النمو ضعيف
٧% ساجو	تصلب مناسب ونمو مشابة للنمو العادى
نشا + دقيق البطاطس + ساموليتا ٢:١:٢	التصلب والنمو مشابة للبيئة المحتوية على الآجار

٦. الصمغ

وهو من المركبات الطبيعية عديدة التسكر التى تخلق فى الكثير من الأنواع النباتية. ويمتاز الصمغ عموماً بقدرته على زيادة لزوجة الماء حتى عند استعماله بتركيزات منخفضة نسبياً، حيث يتشرب بالماء وينتفخ مكوناً قواماً اسفنجياً شفافاً. ويستخلص الصمغ من بعض النباتات كأشجار الصمغ العربى

والعشبيات مثل *Cyamopsis tetragonolobus* وهو من المصادر الطبيعية لصمغ Galactomannans والذى يتركب من المانوز و الجلاكتوز بنسبة ١.٦-١. ويعتبر الجلاكتومانانز ثانى أكبر مجموعة سكريات متعددة تستخدم فى تخزين السكريات فى النباتات. ويشجع السعر الرخيص لهذا المنتج وقدرته على تصلب البيئة على استعماله كبديل للآجار. وقد استعمل Lucyszyn *et al.* (2006) خليط من الجلاكتومانانز المستخلص من نباتات *Cassia fastuosa* و *C. tetragonolobus* والآجار بمعدل ٣ و ٠.٣% على التوالى لإكثار نباتات الفراولة. واظهرت دراسة الخواص الطبيعية للبيئة تأثير جيد للخليط، كذلك كان نمو الأشطاء والجذور أفضل بالمقارنة مع استعمال الآجار بمفرده.

ومن أنواع الصمغ التى استعملت لتصلب البيئات فى مزراع الأنسجة صمغ الكاترا Katira Gum وهو مادة عديدة التسكر غير ذائبة تحتوى على ٥٠% بنتوز وجلاكتوز تفرز من لحاء أشجار *Cochlospermum religiosum* وهو شبية بالصمغ العربى المفرز من أشجار *Acaccia arabica* وله عدة استعمالات صناعية ودوائية. وبالتحلل المائى فى وجود أيونات المعادن ينتج ١٤% حامض الخليك وحامض الجوندك والزيلوز والجلاكتوز و α-cochlospermic. وتم استخدام صمغ الكاترا بنجاح للحصول على بيئة شبه صلبة صالحة لتكوين الأشطاء والجذور والأجنة الجسدية ويوضح جدول رقم (٢-١٦) مقارنة بين استعمال صمغ الكاترا والآجار على تكوين الكالس والجذور فى نباتات *Syzgium cuminii* وتكوين الأجنة الجسدية فى نباتات *Albizzia lebeck* كما أوضحها Jain & Barbbar (2002). حيث يتضح من النتائج عدم وجود فروق بين كلا المادتين.

جدول ٢-١٥: تأثير الآجار والساجو على الإكثار الدقيق لبعض الطرز الوراثية من نباتات البطاطس (Naik & Sarkar, 2001).

الطرز الوراثى	الوزن الجاف		عدد الأوراق/نبات		عدد العقد/نبات		ارتفاع الأفرع (مم)	
	الآجار	الساجو	الآجار	الساجو	الآجار	الساجو	الآجار	الساجو
CP-2270	٨٠.٧	٨١.٤	٩.٥	٨.٩	٩.٥	٨.٠	٨٢.١	٨٦.٤٠
CPU-199	١٠٨.٧	٩٤.٠٢	٧.٥	٧.٦	٦.٦	٧.٠	٥٦.٩	٤٥.٦
Huachapa	١٢٢.١	١٧٧.٨	٨.٧	٩.٣	٧.٩	٨.٤	٧٥.١	٨٢.٢
I-1035	١٠٢.١	١٦٢.٢	٨.٦	١٠.٦	٦.٩	٨.٩	٣١.١	٦٩.٠
Imilla Blanca	١٩٣.٤	١٤٤.٤	١٢.٠	١٠.٤	١٠.٩	٩.٧	١١٩.٤	٩٤.٨
Kufri Badshah	٩٣.٥٠	١١٨.٩	٩.٠	١٠.٨	٨.٥	١٠.٠	٨٣.٢	٩٩.٣
K. Jyoti	٩٣.٦	٨٧.٦	٩.٠	١١.٢	٨.٠	١٠.٢	٦٦.١	٩٦.٦
K. Lalima	٨٨.٣٥	٨٨.٩٣	٧.٦	٧.٦	٧.١	٧.٣	٢.٤٦	٦٦.٤
K. Neela	٩٥.١٧	٨٦.١٧	٨.٢	٨.٦	٧.٠	٨.٣	٧٥.٧	٧٥.٥
K. Sindhuri	٩١.٢٨	٩٦.٦٢	٧.٠	٧.٧	٦.٣	٦.٨	٧٠.٩	٧٤.٧
LSD 5%	٤٢.٥١		٢.١		١.٩		١٨.٣	

وتم أيضاً الحصول على القوام الصلب للبيئة باستعمال خليط من الصمغ بنسبة تتراوح بين ١ و ٣% مع الآجار بنسبة ٠.٢-٠.٦% وتوضح نتائج Jain & Barbbar (2002) فى جدول رقم (٢-١٧) أثر هذا الخليط على لزوجة البيئة وتكوين الأشطاء والجذور فى *S. cuminii* وأشجار *Albizzia lebeck* بجدول رقم (٢-١٨). وكانت

لزوجة البيئة المحتوية على تركيز ٣% من الصمغ تعادل ١٨% من تلك المحتوية على ٠.٩% آجار ويعنى ذلك أن حركة الأوعية المحتوية على البيئة ستؤدى إلى غمر الأجزاء النباتية مما يقلل التهوية ويزيد من مشكلة التميؤ الزجاجى. وبالرغم من ذلك كانت هناك استجابة موجبة فى نمو هذه الأجزاء مما يعنى توفر التهوية بطريقة غير معروفة. أما زيادة التركيز عن ٣% فقد أدت إلى تكوين وسط شديد التماسك يصعب معه صب البيئة.

جدول ٢-١٦: مقارنة الآجار بصمغ الكاترا كمصلب للبيئة المستعملة لزراعة أنسجة نباتات *Syzgium cuminii* و *Albizzia lebeck* كما أوضحها Jain & Barbbar (2002).

الصفة	المادة المصلبة	
	صمغ الكاتيرا	الآجار
تكوين الكالس فى *S. cuminii*		
عدد الأجزاء النباتية	٤٠	٤٠
للأجزاء المستجيبة%	٧٥	٨٠
عدد الأشطاء/للجزء النباتى المستجيب	٢.٥	٣
متوسط طول الأشطاء (سم)	١.٠	١.٢
تكوين الجذور فى *S. cuminii*		
عدد الأجزاء النباتية	٢٢	٢٤
للأجزاء المستجيبة%	٩٠	٩١
متوسط طول الجذر (سم)	٢.٥	٢.٤
تكوين الأجنة الجسدية فى *A. lebeck*		
عدد الأجزاء النباتية	٢٨	٣٠
الأجزاء المستجيبة%	٧٥	٨٠.٠
عدد الأجنة/للجزء النباتى المستجيب	٣.٩	٤.٢

جدول ٢-١٧: تأثير خلط الآجار (A) وصمغ الكاترا (G) على لزوجة البيئة واستجابة الأنسجة المنزرعة لنبات *Syzgium cuminii* كما أوضحها Jain & Barbbar (2002).

المادة المصلبة %	اللزوجة (Pa S)	عدد المُستأصلات	المُستأصلات المستجيبة (%)	طول الأشطاء (سم)	عدد الأشطاء/ للمستأصلات
1G+0.2A	٢.٠٣٧	٤٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠
1G+0.4A	٥.٩٣٦	٤٠	٤٠.٥	٠.٠	٠.٠
1G+0.6A	٥.٤٥٩	٤٠	٥٢.٦	٢	٠.٧
2G+0.2A	٦.٦٧٧	٤٢	٠.٠	٠.٠	٠.٠
2G+0.4A	٦.٢٨٢	٤٢	٦١.٩	٢	٢.٥
2G+0.6A	٨.٣٥٠	٤٢	٥٩.٥	٣	٣.٤
3G+0.2A	١.٩٢١	٤٢	٤٥.٢	٠.٠	٠.٠
3G+0.4A	٤.٨٢٦	٤٠	٦٠.٦	٣	٢.٥
3G+0.6A	٤.٧٨٠	٤٠	٦٧.٥	٨	٣.٨
3G	٦.٠٥٨	٤٢	٦٥.٥	٩	٤.٠
0.9A	٣٩.١٧	٤٦	٦٩.٦	١	٤.٢

جدول ٢-١٨: تأثير خلط الآجار (A) وصمغ الكاتيرا (G) على لزوجة البيئة وتكوين الأجنة الجسدية فى نبات *Albizzia lebeck* كما أوضحها Jain & Barbbar (2002).

المادة المصلبة %	اللزوجة (Pa S)	عدد الأجزاء النباتية	عدد الأجنة/جزء نباتى مستجيب	الأجزاء المستجيبة %
1G+0.2A	٢.٠٣٧	٤٠	٠.٠	٠.٠
1G+0.4A	٥.٩٣٦	٤٦	٠.٠	٠.٠
1G+0.6A	٥.٤٥٩	٤٦	٠.٠	٠.٠
2G+0.2A	٦.٦٧٧	٤٢	٠.٠	٠.٠
2G+0.4A	٦.٢٨٢	٤٠	٠.٠	٥٢.٢
2G+0.6A	٨.٣٥٠	٤٤	٣.١	٨٤.١
3G+0.2A	١.٩٢١	٤٨	٠.٠	٠.٣
3G+0.4A	٤.٩٢٦	٤٦	٢.١	٧٨.٧
3G+0.6A	٤.٧٨٠	٤٤	٣.٣	٨٦.٤
3G	٦.٠٥٨	٤٤	٣.١	٧٢.٧
0.9A	٣٩.١٧	٤٤	٣.٥	٩٣.٢

(A) الآجار، (G) صمغ الكاتيرا

وعند خفض تركيز الصمغ إلى أقل من ٣% مع إضافة الآجار بتركيز ٠.٢-٠.٦% لم تستجب الأجزاء المنزرعة وخاصة *Albizzia lebeck* حيث لم تتكون أى أجنة جسدية ويرجع ذلك إلى عدم صلابة البيئة بدرجة كافية لتدعيم الأجزاء المنزرعة وتوفير التهوية لها، ولم يختلف تركيز ٣% من الصمغ عن ٠.٩% آجار. بالإضافة إلى ذلك لم تلاحظ زيادة فى سيولة البيئة خلال مدة التجربة والتى استمرت شهرين مما يؤكد عدم حدوث تحلل للصمغ.

٧.الفيرمكيوليت Vermiculite

ليس من الشائع حتى الآن استخدام الفيرمكيوليت وهو عبارة عن سيليكات مائية كبديل للآجار حيث تتحرر بعض الإيونات كالبوتاسيوم عند تعقيمه. لكن قام Al-Qahtani & Alkhateeb (2008) بدراسة نمو الأجنة الجسدية لأحد أصناف النخيل باستعمال بيئة تحتوى على الأجار والفيرمكيوليت والبيتموس والبيرليت. وقد أشار إلى إمكانية نمو تلك الأجنة فى البيئات المختلفة إلا أن أفضل نمو كان عند استخدام الفيرمكيوليت ثم الآجار، أما إنبات الأجنة فكان أفضل فى بيئة الفيرمكيوليت. وكان الإنبات ضعيف جداً عند استعمال البيرليت أو البيتموس.

قام Afreen-Zobayed *et al.* (2000) باستعمال خليط مكون من نسب مختلفة من الفيرمكيوليت ومخلفات مصانع الورق من paper pulp لتنمية نبيتات البطاطا *Ipomoea batatas* الناتجة من الإكثار الدقيق فى المعمل ومقارنة ذلك بالبيئة المستعمل فيها الآجار. وأشارت الدراسة إلى أن استعمال خليط مكون من ٧٠% من الفيرمكيوليت مع لب الورق كان أفضل من استعمال الآجار أو أى من النسب الأخرى من خليط الفيرمكيوليت مع لب الورق، حيث يتضح من جدول رقم (٢-١٩) أن الوزن الطازج للأفرع والجذور كان أعلى بمعدل ٢.٧% بالمقارنة من النبيتات النامية فى بيئة مصلبة بالآجار.

كما كانت قياسات النمو للأجزاء الخضرية متمثلة فى ارتفاع الساق وعدد الأوراق أفضل بوجه عام. أضف إلى ذلك أن معدل البناء الضوئى لتلك النباتات كان أعلى من نباتات المقارنة، فبعد ثلاثة أسابيع من الزراعة كان معدل استهلاك ثانى أكسيد الكربون ١٥.٣ مليمول/ساعة مقابل ٩.٨ فقط للنباتات النامية فى بيئة الآجار. يشير ذلك إلى أن النباتات أصبحت ذاتية التغذية بدرجة أكبر، وبالتالى يتوقع سهولة أقلمتها. وتجدر الإشارة إلى أن النباتات النامية فى بيئة من الفيرمكيوليت فقط كانت غير

جيد النمو بالمقارنة مع الخليط المكون من ٧٠% فيرمكيوليت و ٣٠% لب الورق. لكن لم يكن هناك فرق معنوى فى قابلية النباتات للأقلمة حيث تراوحت النسبة بين ٩٠-١٠٠% للنباتات الناتجة من بيئة محتوية على أى نسبة من الفيرمكيوليت ولب الورق. أما النباتات الناتجة من بيئة متصلبة بالآجار فكانت نسبة نجاح أقلمتها ٧٣% فقط. وامتد تأثير بيئة النمو إلى النباتات بعد الأقلمة حيث كانت النباتات التى نمت فى بيئة محتوية على الفيرمكيوليت ولب الورق أطول سوقاً وذات عدد أكبر من الأوراق. وتجب الإشارة إلى تحرر بعض البوتاسيوم من الفيرماكيوليت اثناء التعقيم الحرارى.

٨.الكاراجينين والجيلاتين K-carrageena and Gelatin

يحتاج K-carrageenan إلى وجود بعض الكاتيونات لتصلبه كما هو الحال فى Gelrite ويستعمل بتركيز ٠.٦% ليعطى صلابة تعادل ٠.٢% من Gelrite أو ٠.٨% أجار. حاول البعض استخدام الجيلاتين بتركيز ١٠% لكنه لا يستخدم كثيرا حيث ينصهر عند درجة حرارة ٣٠-٣٥ °م كما يعتبر وسط مثالى لنمو الميكروبات. وهناك العديد من المركبات التى تم استخدامها كبدائل أخرى للآجار كالصوف الزجاجى أو الصخرى، كرات صغيرة من الزجاج، ورق الترشيح فوق البيئة السائلة، استعمال قطع من الإسفنج تحت ورقة الترشيح. كما يمكن تحميل المُستأصَل النباتى على مادة ذات ثقوب ومنها بعض الأغشية المصنعه من البولى بروبلين مثل Celgard 3500, Questar Corp., Charlotte, N.C. واعطت نمو جيد بالمقارنة مع البيئات السائلة الثابتة أو الآجار ويميز هذه المواد إمكانية استعمالها أكثر من مرة كما يمكن تغيير البيئة وإعادة تقسيم المزرعة دون الحاجة إلى تغيير الوعاء المستعمل أثناء الزراعة، سهوله نقل النباتات للتربة، استعمال قدر قليل من البيئة (Thorpe *et al.*, 2008).

جدول ٢-١٩: مقارنة تأثير الآجار وخليط الفيرمكيوليت مع لب الورق على نمو نبيتات البطاطا *Ipomea potatas* فى مزارع الأنسجة (Afreen-Zobayed *et al.*, 2000)

المادة المصلبة	وزن الجذور (ملجم)		وزن السوق (ملجم)			الأوراق		
	الجاف	الطازج	الجاف	الطازج	الجاف	الوزن الطازج (ملجم)	مساحة (سم٢)	عدد الأوراق
Agar	١٨.٤	٢٧٢	٦.٨	٨٠	٤٠	٥٢٣	٢٠.٩	٤.٥
*V:P (100:0)	٣١	٣٨٧	٨.٠	١١٣	٦١	٦٧١	٢٨.٦	٤.٣
V:P (90:10)	٦١	٦٧٣	٩.٩	١٢٦	٨٣	٩٨٣	٣٢.٦	٤.٨
V:P (83:17)	٦٨	٧٣٠	١٢.٤	١٧٣	٩٦	١٢٢٥	٤٠.٠	٤.٥
V:P (70:30)	٧٠	٧٣٢	١٧.٣	٢١٤	١١١	١٤٣٣	٤١.٧	٤.٨
V:P (50:50)	٦١	٦٨١	١٣.٤	١٧٤	٩١	١١٢٧	٣٦.١	٤.٨
V:P (30:70)	٦٢	٧٠٠	١٢.٦	١٧٢	١٠١	١١٦٨	٣٨.٠	٥.٤
V:P (10:90)	٤٥	٥٦١	١٢.١	١٦٧	٩٠	١١٣٠	٣٧.٠	٤.٤

* الفيرمكيوليت (V) و لب الورق (P)

رابعاً: الماء

يحتوى ماء الصنبور على كثير من الأملاح والمواد العضوية التى تختلف كماً ونوعاً من مكان إلى آخر. ولما كان الماء يمثل أكثر من ٩٥% من البيئة المستعملة فإنه من الضرورى استعمال ماء ذو نقاوة عالية بقدر الإمكان. ويتم تنقية الماء معملياً إما بالتقطير أو بالتبادل الأيونى. ويزيل التبادل الأيونى محتوى الأيونات المعدنية للماء، لكن تتحرر بعض المركبات العضوية من جهاز الاستخلاص. لذا يفضل وضع مرشح

بعد جهاز الاستخلاص لمنع مرور هذه الجزيئات. أما التقطير فإنه يزيل الجزيئات العضوية الكبيرة لكن بعض الأيونات المعدنية والمواد المتطايرة مثل الأمونيا والكلور تتحرر مع البخار. وقد تتطاير بعض هذه المواد من الماء المتكثف أثناء التكثيف بشرط ألا يكون ماء المكثف بارداً جداً. وعند بدء عملية التقطير يفضل استبعاد أول كمية من الماء لمدة ١٥-٢٠ دقيقه لأنها قد تحتوى على بعض المواد الطيارة التى يتم تطايرها قبل غليان الماء. وحتى لا يتم تراكم بعض المواد فى المسخن والتى قد تتكسر بالحرارة يجب تنظيف المسخن من مرة إلى أخرى تنظيفاً جيداً باستعمال حمض الهيدروكلوريك المخفف ثم شطفه بماء مقطر. وفى حالة الماء العسر يفضل تنقية الماء بالتبادل الأيونى قبل التقطير لتجنب ترسيب الأملاح الزائدة فى جهاز التقطير. ويفضل دمج الطريقتين أى التقطير والتبادل الأيونى معاً للحصول على ماء عالى النقاوة.

وتستخدم معظم معامل زراعة الأنسجة ماء منقى بالتبادل الأيونى ثم يقطر أو ماء مقطر مرتين، وعلى العموم يفضل استعمال الماء المقطر مرتين فى تجارب مزارع الأنسجة. ويجب عدم تخزين الماء لمدة طويلة عقب تقطيره، وفى حالة التخزين يفضل أن تكون الأوعية المستعملة من البولى إثيلين أو زجاج البيركس لأن الأنواع غير الجيدة من الزجاج يتحرر منها مواد مثل الرصاص والصوديوم. وبالطبع تمثل عملية تقطير الماء نسبة عالية من تكاليف البيئة ومن ثم تلجأ بعض المعامل التجارية إلى استعمال ماء الصنبور إذا كان خالياً من العناصر الثقيلة والملوثات فقد أشار Ahloowalia & Prakash (2004) إلى نجاح بعض الباحثين فى استعمال ماء الصنبور فى إكثار الموز و *Zingiber officinale*. ويمكن استعمال الماء المعبأ المخصص للشرب وكذلك الماء المتجمع من سقوط الأمطار (Prakash *et al.*, 2004).

خامساً: تركيز أيونات الهيدروجين (الرقم الهيدروجينى pH)

يتضح من استعراض العناصر الغذائية المكونة للبيئة أن امتصاص الأيونات المختلفة يتوقف بدرجة أساسية على الرقم الهيدروجينى للبيئة. أو بمعنى آخر تركيز أيونات الهيدروجين فى الوسط، ومن المعروف أن مقياس الرقم الهيدروجينى يبدأ من ١ إلى ١٤ ونقطة التعادل هى ٧ وبانخفاضها تزيد الحموضة وبزيادتها عن ٧ تزيد القلوية. والماء المقطر الخالى من الغازات مثل ثانى أكسيد الكربون يكون متعادلاً. ويتراوح الرقم الهيدروجينى لسيتوبلازم الخلايا بين ٦.٧ - ٧.٧ أما الفجوات العصارية فرقمها الهيدروجينى ٤-٦ وأثناء عمليات الأيض تتكون مركبات حمضية يجب معادلتها. وأهم طرق معادلة هذه المركبات هو مصاحبتها لأيون الهيدروجين أو البوتاسيوم حتى يتم ضخها خارج الخلايا ومعادلتها بالهيدروكسيل، ومن الجدير بالذكر أن للرقم الهيدروجينى تأثير مشابه لبعض منظمات النمو حيث يؤدى تغيير الرقم الهيدروجينى الخلوى وكمية أيونات الكالسيوم فى المُستأصَل النباتى إلى تغيير الرقم الهيدروجينى للسيتوبلازم وذلك بطريقة تشابه تأثير الأوكسين والذى تفسر إحدى آليات عمله فى تحرير أيون الهيدروجين من جدر الخلايا (Felle, 2001).

وعلى العموم فإن النباتات فى مزارع الأنسجة تكون غير حساسة بدرجة عالية لتغير الرقم الهيدروجينى فى مدى يتراوح بين ٤.٥ و ٧، وإذا انخفض الرقم الهيدروجينى عن هذه القيمة أو زاد عنها فإن نمو الأنسجة يقف غالباً. فالإنخفاض الشديد فى الرقم الهيدروجينى يعمل على تحول الفوسفات العضوى إلى غير عضوى ويقل تخليق المركبات الناقلة للطاقة وبالتالى ينخفض معدل النمو (Mimura *et al.*, 2000). وعند الحديث عن الرقم الهيدروجينى للبيئة يؤخذ بعين الاعتبار ثلاث نقاط وهى تأثيره على مكونات البيئة، وتأثيره المباشر على الخلايا النباتية، وكذلك تأثيره

على التفاعل بين الخلايا والبيئة. والرقم الهيدروجينى المناسب للبيئة لا بد أن يفى بالشروط التالية.

- لا يعيق الوظائف الحيوية للأغشية الخلوية والسيتوبلازم.
- ضمان عدم ترسيب الأملاح فى الوسط المغذى.
- لا يؤثر على امتصاص مكونات البيئة والهرمونات.
- لا يؤثر على تصلب البيئة.

تأثير الرقم الهيدروجينى للبيئة على امتصاص مكوناتها

ربما ينحصر تأثير الرقم الهيدروجينى على مزراع الأنسجة على امتصاص وثبات مكونات البيئة المختلفة وليس على الخلية نفسها بطريقة مباشرة (Mimura *et al.*, 2000) وبصورة عامة يزيد امتصاص الأيونات سالبة الشحنة فى الوسط الحامضى بينما يزداد امتصاص الكاتيونات فى الوسط القلوى. وبالطبع يؤدى امتصاص الأيونات إلى تغير الرقم الهيدروجينى للبيئة كما ذكر عند مناقشة امتصاص الأمونيا والنترات. وبذلك يؤثر الرقم الهيدروجينى للبيئة على تيسر وامتصاص بعض العناصر والأيونات غير العضوية، فامتصاص الفوسفات مثلاً يكون سريعاً فى الوسط الحامضى ويقل بزيادة الرقم الهيدروجينى، وعندما يصل الرقم الهيدروجينى للبيئة إلى ٦.٢ يتحد الحديد إن لم يكن موجوداً فى صورة مخلبية مع الفوسفات ليكون فوسفات الحديدوز غير الذائبة. كذلك يتأثر امتصاص الأيونات العضوية بالرقم الهيدروجينى للبيئة فيزيد امتصاص معلق خلايا الدخان لحامض الليسين بانخفاض الرقم الهيدروجينى للبيئة، كما يتأثر امتصاص منظمات النمو مثلNAA و IAA و 2,4-D و ABA ويزيد تأثير الرقم الهيدروجينى على امتصاص مكونات البيئة بزيادة الفرق بين الرقم الهيدروجينى للبيئة وسيتوبلازم الخلايا.

اختيار وضبط الرقم الهيدروجينى للبيئة

على العكس من النباتات النامية فى تربة طبيعية حيث تنمو الجذور جيداً فى تربة ذات رقم هيدروجينى ٦.٠-٧.٣ فإن معظم الخلايا فى مزارع الأنسجة تتحمل الرقم الهيدروجينى ٤.٥-٧.٢ وتموت عند الرقم الهيدروجينى الأقل من ٢.٥-٣.٠ أو أعلى من ٨.٠. ويوضح جدول رقم (٢-٢٠) تأثير تباين الرقم الهيدروجينى عند تحضير البيئة على نمو نبيتات البطاطس عقب زراعة العقد الساقية. وعلى العكس من ذلك وضح Bhatia & Ashwatha (2005) أن تكشف ونمو الأشطاء من الأوراق الفلقية للطماطم لم يتأثر بصور كبيرة باستعمال بيئة ذات رقم هيدروجينى يتراوح بين ٤.٥ و ٧.٥ ، وربما يشير ذلك إلى اختلاف استجابة النوع النباتى. وفى معظم الحالات يتم ضبط الرقم الهيدروجينى عند تجهيز البيئة على ٥-٦ ويفضل أن يكون لمزارع النباتات الخشبية ٥.٢ أما العشبيات فيفضل أن يكون ٥.٨. ومن الواضح أن هذه القيم أقل من المتبع فى المزارع المائية حيث تتراوح بين ٦.٠ و٧.٣. وهناك تباين بسيط فى الرقم الهيدروجينى للبيئات المختلفة اعتماداً على نوع النبات والنسيج المنزرع. ويعتقد Sarma *et al.* (1990) أن طريقة إضافة الآجار إلى البيئة تلعب دوراً فى التغير الحادث فى الرقم الهيدروجينى فعند اضافة الآجار إلى بيئات MS و B-5 و N6 ثم تعقيم البيئة فإن الرقم الهيدروجينى ينخفض. وكان الانخفاض اقل عند خلط الآجار فى الماء المقطر ثم إضافته للبيئة قبل التعقيم وكان الانخفاض فى كلا الحالتين تدريجياً مع الزمن، وأصبحت البيئة أكثر حموضة عندما زرع عليها كالوس نباتات *Panax ginseng*.

وعادة يتم استخدام هيدروكسيد الصوديوم أو البوتاسيوم لرفع الرقم الهيدروجينى إذا كانت حمضية حيث يتحد OH^- مع H^+ البيئة ليكون ماء وبذلك يرتفع الرقم الهيدروجينى للبيئة. وإذا كان الرقم الهيدروجينى مرتفعاً فيضاف HCl الذى يتأين فى الوسط ويتحد H^+ مع OH^- البيئة ليكون ماء وينخفض الرقم

الهيدروجينى. وحيث أن الوزن الجزيئى لهيدروكسيد الصوديوم هو ٤٠ فيضاف ٤ جم منها إلى ١٠٠ مل ماء ليعطى محلول تركيزه ١ مليمول. أما الوزن الجزنى لحامض الهيدروكلوريك ٣٦.٥ لكنه يباع فى صورة محلول تركيزه ٣٨% ومن ثم فإن ٩.٦ مل منه تضاف إلى ١٠٠ مل ماء لتعطى ١ مليمول.

جدول ٢-٢٠: تأثير الرقم الهيدروجينى على نمو نباتات البطاطس المنزرعة بالعقد الساقية (Sanavy & Moeini, 2003).

الرقم الهيدروجينى	طول النبات (سم)	عدد العقد الساقية	عدد الجذور	طول الجذور (سم)
٤.٥	٤.٨٤	٤.٦	٣.٨	٧.٣٨
٥.٠	٦.٥٢	٥.٤	٧.٢	١١.٠٠
٥.٥	٧.٨٢	٨.٦	١٠.٤	١٣.٢٨
٦.٠	٦.٨٠	٧.٢	٤.٢	١١.٩٢
٦.٥	٥.٦٢	٦.٢	٦.٢	١٠.٣٦

للخلايا النباتية القدرة على التحكم فى ثبات الرقم الهيدروجينى للسيتوبلازم ويكون لتغيير الرقم الهيدروجينى فى البيئة تأثير مؤقت على سيتوبلازم الخلايا حيث تعمل الخلايا على إعادة الرقم الهيدروجينى إلى وضعه الطبيعى (Parton *et al.*, 1997). وتعمل بعض المركبات فى البيئة كأملاح النترات والأمونيا وكذلك المواد المصلبة كالآجار والجل رايت على ثبات نسبى للرقم الهيدروجينى. حيث يؤدى امتصاص الأيونات المشار إليها إلى تغير الرقم الهيدروجينى، ويتوقف ذلك على المكونات الأخرى للبيئة وطريقة التعقيم والنبات المنزرع. ومن الطبيعى أن ينخفض الرقم الهيدروجينى فى البيئة المحتوية على NH_4^+ و NO_3^- بعد ضبطه على ٥.٨ عند

إعداد البيئة. لكن يعود الرقم الهيدروجينى للارتفاع مرة أخرى حتى يصل إلى درجة قريبة من أو أعلى من تلك الابتدائية Prknov (2007) و Lucyszyn *et al*. (2006).

وقد أشار Ramage & Williams (2002) إلى انخفاض فى الرقم الهيدروجينى وعدم تكشف أشطاء عند زراعة الأقراص الورقية لنبات الدخان فى بيئة تحتوى على الأمونيا فقط كمصدر للنتروجين بينما لم يسجل ذلك الانخفاض وتكشفت الأشطاء عند اضافة النترات مع الأمونيا. وقد سبق تفصيل تأثير النترات والأمونيا على ثبات الرقم الهيدروجينى للبيئة عند الحديث عن النتروجين كأحد مكونات البيئة.

وربما تضاف بعض الأحماض العضوية للبيئة للعمل على ثبات الرقم الهيدروجينى عند ٥.٥ تقريباً. لكن فى بعض المزارع المتخصصة كمزارع البروتوبلاست وزراعة المعلق الخلوى بكثافة منخفضة يتطلب الأمر استعمال بعض المركبات المتخصصة مثل Tris(hydroxymethyl)aminomethane, TRIS و MES, وغيرها لثبات الرقم الهيدروجينى. وقد سجل Klein & Manos (1960) زيادة فى نشاط نمو لخلايا الدخان عند اضافة MES بتركيز ٠.٥ ميكرومول. وهناك العديد من الدراسات التى تبين التأثير الإيجابى لـMES على تنظيم الرقم الهيدروجينى ونمو مزارع أنسجة العديد من الأنواع النباتية. وعموماً لا يعتبر MES ساماً للخلايا النباتية على الرغم من أشارة De Klerk *et al*. (2008) إلى انخفاض معدل تكوين الجذور على سيقان التفاح بزيادة تركيز MES ولم يكن هناك تأثير مفهوم لذلك التثبيط الذى لوحظ فى الأيام الأولى من الزراعة اثناء نشوء القمم الميرستيمية واختفى فعله أثناء طور النمو. وقد لاحظ Woodward *et al*. (2006) زيادة عد الأشطاء المتكشفة فى مزرعة لأشجار *Eucalyptus marginata* عند اضافة MES للبيئة وكان أفضل معدل لتكوين الجذور عند تركيز ٧.٥ مليمول من النتروجين بنسبة ٢:١ نترات إلى أمونيا وإضافة ١٠ مليمول من MES لتنظيم الرقم الهيدروجينى. ولم يكن للتركيز الأقل

من MES القدرة على تنظيم الرقم الهيدروجينى خلال أربعة أسابيع من الزراعة عند استعمال النترات كمصدر وحيد للنتروجين. كذلك يقلل وجود الفحم المنشط من انخفاض الرقم الهيدروجينى أثناء الزراعة حيث كان فى مدى ٥.٤ -٦.١ خلال ثلاث أسابيع من زراعة أنسجة نباتات *Lagerstroemia indica* فى بيئة MS، أما فى حالة عدم وجود الفحم المنشط فقد انخفضت القيمة إلى ٣.١ -٤.٧ خلال نفس المدة. ولم يكن لـ BA تأثيراً معنوياً على الرقم الهيدروجينى فى هذه الحالة، لكن كان للتداخل بين الفحم المنشط والتعقيم تأثيراً معنوياً فى انخفاض الرقم الهيدروجينى للبيئة وارتبط تأثير كل منهما بوجود الآخر كما هو مبين فى جدول رقم (٢-٢١) كما أوضحه Eymar *et al.* (2000).

جدول ٢-٢١: تأثير الفحم المنشط، BA والتعقيم على الرقم الهيدروجينى ودرجة التوصيل الكهربى لبيئة MS المستعملة لزراعة أنسجة نبات *Lagerstroemia indica* كما أوضحه Eymar *et al.* (2000).

العامل		درجة التوصيل الكهربى dsm^{-1}	الرقم الهيدروجينى
الفحم المنشط	موجود	١.٦٣	٥.٩٠
	غير موجود	١.٥٢	٥.٢١
BA	٥ ملجم/لتر	١.٥٧	٥.٥٤
	غير موجود	١.٥٨	٥.٥٧
التعقيم	قبل	١.٥٢	٥.٧٤
	بعد	١.٦٣	٥.٣٨
المتوسط		١.٥٧	٥.٥٥

تأثير التعقيم والحفظ على الرقم الهيدروجينى

يحدث تغير بسيط جداً فى الرقم الهيدروجينى للبيئة يتراوح بين ٠.٣-٠.٥ أثناء التعقيم إذا كانت البيئة خالية من السكر وتركيز الفوسفات بها منخفض. ويكون الانخفاض اقل نسبياً إذا كانت البيئة محتوية على السكر أما البيئة المحتوية على المالتوز، أو الجلوكوز، أو الفركتوز فيكون الانخفاض فيها أكثر. ويتوقف مدى الانخفاض على الرقم الهيدروجينى عند التحضير حيث ينخفض إلى ٤.٢ و ٥.١ و ٨.١ بعد ضبطه عند تحضير البيئة على ٥.٠ و ٦.٤ و ٨.٥ على التوالى. وعند تعقيم البيئة السائلة المحتوية على السكر ينخفض الرقم الهيدروجينى إلى ٥.٧١-٧.٥٠ كما يؤدى الآجار المضاف إلى البيئة إلى انخفاض بسيط فى الرقم الهيدروجينى ليتراوح بين ٤-٤.٦ إذا كانت البيئة مجهزة على نفس الرقم الهيدروجينى، ويتوقف مدى الانخفاض على تركيز الآجار. وذلك لحدوث تحلل مائى لبعض المركبات العضوية فى البيئة أثناء التعقيم فى وسط حامضى، وقد يعزى التحلل المائى الحادث فى البيئة إلى نوع الآجار المستخدم.

ونلاحظ أن الآجار لا يتصلب عند انخفاض الرقم الهيدروجينى للمزرعة إلى ٤.٥-٥.٤ كذلك فإن جزء من السكر المضاف يتحلل مائيا عند الرقم الهيدروجينى ٥.٥ ويزيد التحلل بارتفاع درجة الحرارة. ويرجع أغلب التغير فى الرقم الهيدروجينى إلى سلفات الحديدوز غير المخلبية ونترات البوتاسيوم (فى حالة استعمال الحديد فى صورة غير مخلبية). وقد سجل Skirvin *et al.* (1986) انخفاض الرقم الهيدروجينى لوسط MS السائلة أو المضاف إليها Difco Bacto بتركيز ٦ جم/لترمن ٥.٧ إلى ٤.٦ عقب التعقيم مباشرة ووصل إلى ٤.١ و ٤.٤ بعد ستة أسابيع من تحضير البيئة السائلة والصلبة على التوالى. ويقلل الفحم المنشط المضاف للبيئة من الانخفاض الحادث عند التعقيم كما يبين جدول رقم (٢-٢١). وتزيد حموضة البيئة سواء كانت معقمة فى

الاوتوكلاف أو بالترشيح بطول فترة التخزين. وللحد من ذلك ينصح بأن يكون التخزين فى الظلام وعلى درجة حرارة منخفضة فى الثلاجة حيث تشير دراسة & Owens Wozniak (1991) إلى عدم حدوث تغيير يذكر فى بيئة MS المضاف إليها السكر والآجار عند تخزينها فى الثلاجة، لكن انخفض الرقم الهيدروجينى إلى ٤.٩ عند تخزينها فى الضوء على درجة حرارة الغرفة. ومن الناحية العملية تظهر المشاكل الآتية إذا كان الرقم الهيدروجينى منخفضاً جداً :

١. عدم ثبات اندول حامض الخليك وحامض الجبريلك.
٢. عدم تصلب الآجار.
٣. ترسيب أملاح الفوسفات والحديد.
٤. عدم ثبات حامض Pantothonic.
٥. إعاقة امتصاص الأمونيا.

سادساً: الضغط الاسموزى للبيئة

من المعروف أن الأملاح غير العضوية تتأين عند إذابتها فى الماء، وعلى هذا فإن ضغطها الاسموزى هو محصلة اسموزية عيارية مكونات الملح وليست عيارية الملح نفسه فمثلا ٠.١ مول من كلوريد البوتاسيوم يعطى نظرياً ضغطا اسموزيا قدرة ٠.٢ حيث أنه يتأين فى المحلول إلى ٠.١ مول من البوتاسيوم و ٠.١ مول من الكلوريد. لكن لا يتحقق ذلك عملياً فحساب اسموزية البيئة عملية معقدة جداً وتعتمد على درجة الحرارة والوزن الجزئى للأملاح وتركيزها ودرجه تأينها. وعملياً يقاس الضغط الاسموزى للبيئة بجهاز الازموميتر، أما الطريقة الحسابية فتعطى قيمة أعلى من الحقيقية. وكثيراً ما يحدث سوء فهم عند التعبير عن تغيير الضغط الاسموزى للمحلول بإضافة مزيد من المادة المذابة. لكن من المؤكد أن ذلك سوف يجعل قيمة الضغط الاسموزى أكثر سالبة، ويقال عندئذ أن الضغط الاسموزى للمحلول ارتفع، والتعبير العلمى الدقيق لذلك هو أن الاسموزية تنخفض (George, 1993).

ولا يتوقف تأثير السكر والمكونات الأخرى للبيئة على دورها المغذى للأنسجة بل أن لها دوراً آخر غير مباشر بتأثيرها على الضغط الأسموزى للبيئة. وهناك العديد من الدراسات التى تبين أهمية الضغط الأسموزى للبيئة فى استجابة النسيج. فللضغط الأسموزى أهمية كبرى فى حركة الماء والمركبات الذائبة، حيث يتحرك الماء من وإلى الخلايا بناء على التركيز النسبى للمواد الذائبة فى المحلول الخارجى والداخلى. ويكون للخلايا القدرة على امتصاص الماء لو كان لها ضغط سالب عالى وينتج هذا الضغط السالب من إذابة مواد لها ضغط اسموزى فى العصير الخلوى. أى أن قوة الامتصاص تتوقف على تركيز العصير الخلوى وتركيز السائل خارج الخلايا وكذلك على الضغط الجدارى للخلايا الذى يعيق الامتصاص. ولشرح الاسموزية تفصيلياً يمكن الرجوع إلى (George, 1993) أو المراجع المتخصصة فى فسيولوجيا النبات لكن المهم الإشارة إلى أن إضافة المواد الذائبة إلى المحلول يجعل الاسموزية والضغط المائى أكثر سالبيه.

ويفهم من ذلك أن الضغط الاسموزى يزيد للبيئة المحتوية على السكر، فعلى سبيل المثال بيئة MS الخالية من سكر لها ضغط اسموزى ٠.٠٩٥٨ اسمول/كجم (Osmkg) يرتفع إلى ٠.١٨٦ عند إضافة ٣% سكر على درجة حرارة ٢٥ °م أما بيئة B5 المحتوية على ٢% سكر فضغطها الاسموزى 78 = kpa 0.193-) (mOsm/kg على نفس درجة الحرارة. ويبين جدول رقم (٢-٢٢) تأثير تركيز السكر على الضغط الأسموزى لبعض البيئات المعقمة بالترشيح. ويلاحظ أنه بدون تحلل السكر فى البيئة فإن ٨٠ و ٦٠ و ٥٠ % على التوالى من الضغط الأسموزى للبيئات B5 و Schenk & Hildebrandt و MS ترجع إلى اضافة ٣% سكر (Thorpe *et al.*, 2008). أما عند التعقيم بالحرارة فإن تحلل السكر يغير من الضغط الاسموزى. والضغط الاسموزى لأملاح العناصر الكبرى للبيئات الشائعة الاستعمال فى زراعة الأنسجة وبعد اضافة السكر مقدراً بوحدات البار والتى تعادل ٥١٠ بسكال وتساوى ٠.٩٨٧ ضغط جوى كما أوضحه Perik (1987) فى جدول (٢-٢٣).

وبالطبع فإن الجهد الاسموزى للبيئة المضاف إليها الآجار أو المواد المشابهة يكون أقل من تلك السائلة. لكن اشار البعض إلى عدم أهمية المواد المصلبة فى الجهد الاسموزى للبيئة، فقدر Lazzeri *et al.* (1988) أن ٤% من الجهد السموزى لبيئة MS يرجع إلى إضافة ٧ جم/لتر من الآجار، أما النسبة الباقية فترجع إلى الأملاح المعدنية. لكن يجب التلميح إلى أن التركيزات الأعلى من الآجار قد تساعد فى التغلب على مشكة التميؤ الزجاجى وهو ما يشير إلى دور المواد المصلبة فى الجهد الاسموزى للبيئة. وفى بعض الحالات يكون تأثير السكر على مزارع الأنسجة راجعاً للضغط الأسموزى وليس

جدول ٢-٢٢: تأثير تركيز السكر على الضغط الاسموزى للمحلول (Perik, 1987).

تركيز السكر		الاسموزية (Osm/kg)	الجهد الاسموزى عند ٢٥°م (MPa)
% وزن/حجم	مليمول		
٠.١	١٤.٦١	٠.٠١٥	-٠.٠٣٧
١.٠	٢٩.٢١	٠.٠٣٠	-٠.٠٧٤
١.٥	٤٣.٨٢	٠.٠٤٥	-٠.١١٢
٢.٠	٥٨.٤٣	٠.٠٦٠	-٠.١٤٩
٢.٥	٧٣.٠٤	٠.٠٧٥	-٠.١٨٦
٣.٠	٨٧.٦٤	٠.٠٩٠	-٠.٢٢٣
٤.٠	١١٦.٨٦	٠.١٢١	-٠.٣٠٠
٥.٠	١٧٥.٢٨	٠.١٨٦	-٠.٤٦١
٦.٠	٢٣٣.٧١	٠.٢٥٣	-٠.٦٢٧
٨.٠	٢٩٢.١٤	٠.٣٢٤	-٠٠.٨٠٣
١٠.٠	٣٥٠.٥٧	٠.٣٩٦	-٠.٩٨٢

جدول ٢-٢٣: تأثير تركيز السكر على الضغط الاسموزى لبعض البيئات المستعملة فى زراعة الأنسجة (1987) Perik .

الصفة	البيئة			
	White	Hildebrandt	Heller	MS
الضغط الاسموزى لأملاح العناصر	٠.٤٣	٠.٧٦	٠.٩٦	٢.٢٧
الضغط الاسموزى للبيئة مع السكر	١.٤٦	١.٤٦	٢.٢٠	٤.٠٥

لدوره كمصدر للكربوهيدرات، لكن بامتصاص السكر من البيئة يحدث تغيير فى ضغطها الاسموزى، وفى تلك الحالات يمكن الاستعاضة عنه ببعض المواد التى تقلل من الجهد الأسموزى دون أن تدخل فى عمليات الأيض كالسكريات الكحولية مثل المانيتول والسربيتول، وبذلك يظل الضغط الأسموزى ثابتاً. لكن أشار Steinitz (1999) أن تلك السكريات يمكن أن تدخل فى عمليات أيض بعض النباتات ومن ثم يفضل استعمال مركب Polyethylene glycol 4000 (PEG) على الرغم من إشارة Chazen *et al.* (1995) إلى احتواءه على بعض الشوائب السامة لأن وزنه الجزيئى العالى يمنع اختراقه جدر الخلايا. لكن يسبب زيادة تركيز تلك المركبات رفع نسبة حامض الأبسيسك والذى يؤثر بدورة على النمو. كذلك يحفز استعمال PEG 4000 تكوين وانبات الأجنة الجسدية لكثير من النباتات (Stasolla *et al.*, 2003) لأنها تحد من دخول الماء إلى الخلايا فتحاكى تأثير الإجهاد المائى أثناء تطور الجنين، وقد يستعمل ABA مع PEG لنفس الغرض Langhansová *et al.* (2004) .

تأثير الضغط الاسموزى على النمو والتكشف

نخلص مما سبق إلى أن تأثير البيئات المختلفة على النمو والتكشف يعتمد على تأثيرها الغذائى وضغطها الاسموزى. وقد وجد أن ٧٥% من السكر المضاف للبيئة المستخدمة لمزرعة نباتات *Digitalis* ضرورية لتكوين الأفرع العرضية مباشرة على

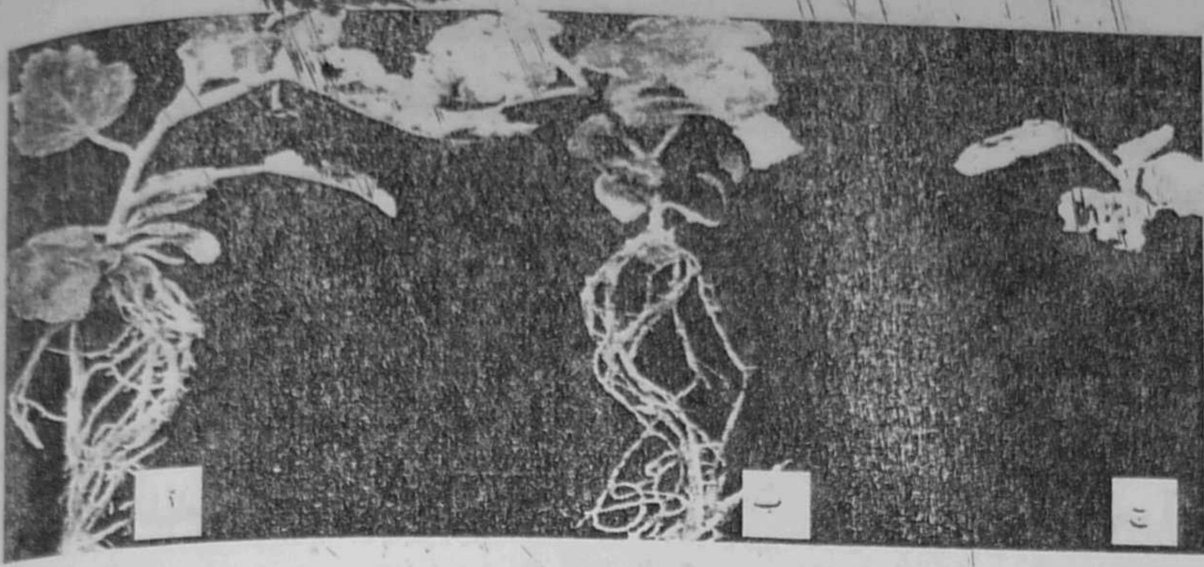
الجزء المنزرع. أما النسبة الباقية من السكر المستخدم فهى لازمة لإحداث الضغط الاسموزى الأمثل لعملية التكشف. لكن تظل ميكانيكية تأثير الضغط الاسموزى على التكشف غير واضحة وإن كان يعتقد أنها تمثل نوع من الإجهاد الذى ربما يشجع تخليق بعض المواد الهامة للتكشف. فمثلاً تفقد الخلايا الموجودة فى ظروف بيئية ذات ضغط اسموزى منخفض جزء من مائها بالمقارنة مع تلك الموجودة فى وسط ذو ضغط اسموزى مرتفع. ولكى تحافظ الخلية على حيويتها لابد أن يقل ضغطها الاسموزى بعمليات بناء محددة كتراكم البرولين وإلا فإن الماء لن ينتقل للخلايا. وبصفة عامة لو كان الضغط الاسموزى أعلى من ٣ بار فإن النمو والتكشف يقف لمعظم النباتات. ويفترض أيضاً أن الماء الموجود فى الخلايا يتم اتزانه قبل الاستطالة والانقسام وعلى هذا فإن الضغط الاسموزى يؤثر فى معدل نمو وانقسام الخلايا وتكشفها. ويقل المحتوى المائى للأنسجة بزيادة الضغط الاسموزى للبيئة ويزيد وزنها الجاف. وعادة التركيز المرتفع من السكر غير سام لكن يحدث انخفاض فى معدل النمو لعدد كبير من أنواع الخلايا فى بيئة MS إذا زاد تركيز السكر عن ٤-٥ %. وقد استخلصت نفس النتائج بإضافة مواد تقلل قيمة الضغط الاسموزى مثل المانيتول والبولى إثيلين جليكول (Razdan, 2002). ونظريًا يعطى تركيز قدرة مولر واحد من المانيتول ضغطاً اسموزياً يعادل -٢٢.٤ بار. لكن لما كان السكر غير سام للخلايا على الأقل فى المدى القصير -حيث أن الخلايا تعاود نشاطها الحيوى مرة أخرى عند خفض تركيزه- فإن زيادة تركيز السكر فى البيئة يستعمل لزيادة مدة حفظ المزرعة دون الحاجة إلى تجديدها حيث تسترد الخلايا قدرتها على النمو عقب النقل إلى بيئة ذات تركيز مناسب من السكر.

الاتزان بين الضغط الاسموزى للبيئة والسكر

لو فرض أن الضغط الأسموزى لا يؤثر فعلاً فى النمو والتكشف لكان تركيز السكرالأمثل للنمو متبايناً من بيئة لأخرى وكان استخدام تركيز أعلى من السكر

ضروريا فى حالة استخدام البيئات ذات تركيز منخفض من الأملاح. ويبين George (1993) أن أعلى معدل نمو للكالوس فى نباتات فول الصويا يمكن الحصول عليه من ٥٠-٧٥% من أملاح بيئة MS مع استعمال ٣-٤% من السكر أو كامل أملاح البيئة لكن بخفض تركيز السكر إلى ٢%. كما تمت دراسة تأثير تركيز السكر على نمو الكالس والتكشف فى نباتات الدخان وأشارت التجارب إلى أن أحسن معدل نمو للكالوس وتكشف الأفرع يحدث عند إضافة ٣% سكر إلى MS. وأمكن الحصول على نفس النتائج عندما استبدل جزء من السكر بالمانيتول ليعطى ضغط اسموزى عالى للبيئة يقدر بـ 0.4-0.6 Mpa وعندما زاد تركيز السكر عن ٣% انخفض التكشف. وكان الضغط الاسموزى لخلايا الكالس التى تكشفت إلى أفرع 0.8 Mpa- أما تلك التى لم تتكشف إلى أفرع فكان ضغطها الاسموزى 0.4 Mpa-.

وغالبا تستخدم بيئة ذات ضغط اسموزى قليل بخفض تركيز الأملاح والسكر لتكوين ونمو الجذور على الأفرع المتكونة فى مزارع الأنسجة، حيث أن التركيزات المرتفعة من الأملاح مثبطة لنمو الجذور. ولذا غالباً تستخدم MS بتركيز نصف أو ربع التركيز الأصلى لتكوين الجذور على الأشطاء التى تكونت فى المرحلة السابقة فى بيئة ذات تركيز عالى من الأملاح. وقد وجد Alkhubry (2008) أن التركيز الكامل لأملاح بيئة MS هو الأفضل لتكوين الجذور على العقد الساقية لنباتات التين (شكل رقم ٢-٥) . ويمثل تركيز الأملاح أهمية أكثر من السكر فى مرحلة تكوين الجذور. وقد يرجع هذا إلى أهمية خفض تركيز النتروجين الكلى عن خفض الضغط الاسموزى. كذلك فإن معظم الأشجار يستحث تكوين الجذور عليها فى تركيز نصف أو ثلث تركيز MSولم يكن لتركيز السكر تأثيراً حرجاً عند خفض تركيز الأملاح لكن وجوده يعتبر ضرورياً.



شكل ٢-٥: العقل الساقية لنباتات التين عقب زراعتها لمدة ٤٥ يوم فى بيئية MS بتركيز كامل (أ) ، ونصف تركيز (ب) وربع تركيز (ج) (Alkhubry, 2008).

تجهيز البيئة

يتوقف نجاح زراعة الأنسجة على عدة عوامل منها محتوى البيئة من العناصر الضرورية للنمو وتناسب تلك المحتويات مع مرحلة زراعة الأنسجة وهى خمسة مراحل كما هو مبين فى الفصل الرابع. فعلى سبيل المثال يتطلب الأمر خفض تركيز الأملاح المعدنية ومصدر الكربوهيدرات فى مرحلة تكوين الجذور للعديد من النباتات، على العكس من مرحلة الإستيلاد التى ربما تحتاج استعمال تركيز عالى من العناصر المعدنية والسكر. كذلك يجب اختيار البيئة المناسبة لتحقيق الغرض المطلوب من زراعة الأنسجة فإذا كان الهدف تخليق المركبات الفعالة فإن الأمر يتطلب إضافة العناصر الهامة فى التخليق الحيوى لتلك المركبات. وقد أجريت عدة محاولات للوصول إلى أفضل تركيبة من العناصر الصغرى والكبرى بالإضافة إلى الفيتامينات وأحياناً بعض المواد الأخرى غير محددة التركيب مثل لبن جوز الهند وكازين اللبن كمصدر للعناصر الغذائية الضرورية للنمو والتكشف. وكان لاستخدام المحاليل المغذية مثل Hoagland و Knop وPfeffer فى المزارع المائية للنباتات أثر هام فى

تطوير تركيب البيئات المستخدمة فى زراعة الأنسجة، على الرغم من فشل الكثير من العلماء الرواد فى مجال زراعة الأنسجة من استخدام تلك المحاليل لنموالأنسجة فى المعمل. فقد كانت البيئات التى استخدمت فى بداية تطوير علم زراعة الأنسجة بسيطة التركيب، وفقيرة فى محتواها من العناصر غير العضوية خاصة من البوتاسيوم والنترات. ويعتبر Nobecourt أول من استطاع إنتاج كالوس من نباتات الجزر باستخدام تركيز مخفف من المحلول المغذى Knop. واعقب ذلك عدة محاولات من مجموعة من العلماء منهم White و Hildebrandt وغيرهم. وقد قام White فى الفترة من ١٩٤٣ حتى ١٩٦٣ بالعديد من التجارب بهدف التوصل إلى وسط غذائى مناسب لزراعة الجذور لإجراء بعض الدراسات على الفيروسات. فقد استغل أحد البيئات التى تستعمل لنمو بعض الطحالب مع إضافة بعض العناصر المعدنية والجليسين وحامض النيكوتنك والثيامين والبيرودكسين. وبالفعل استعملت تلك البيئة لفترة طويلة فى زراعة الأنسجة. وقد كان White صاحب الكتاب الأول عن زراعة الأنسجة والذى شجع الكثير من الباحثين لخوض هذا المضمار الجديد.

لوحظ فى البداية أن النباتات الكاملة يمكنها النمو فى بيئة تحتوى على أيون النترات فقط لكن لم يناسب ذلك زراعة الأنسجة باستثناء مزارع الجذور. ومن ثم كان معظم التغير فى البيئات المستخدمة منصباً على البوتاسيوم والنترات والكالسيوم. وفى عام ١٩٢٢ تم إدخال الأمونيا إلى بيئة مزارع الأنسجة وكان لها أثراً واضحاً فى تحسين نمو عدد كبير من النباتات. وكان لدراسة تأثير تركيز الأمونيا والنترات والبوتاسيوم أعظم الأثر فى إمكانية الحصول على بيئة يمكن استخدامها بنجاح مع عدد كبير من النباتات ولأغراض متباينة. فقد أمكن بزيادة تركيز النترات والبوتاسيوم مع وجود الأمونيا تكوين كالوس وإنتاج أشطاء بطريقة مباشرة وغير مباشرة، وكذلك تكوين الأجنة الجسدية. ورغم أن بعض البيئات تم تركيبها لتلاءم صنف نباتى معين فقد

أمكن استخدامها مع أصناف أو أنواع أخرى لكنها قد لا تعطى النتائج المثلى المستهدفة لهذا الصنف أو النسيج.

وكان لاستعمال النتروجين فى صورة أيون أمونيوم والنترات بالإضافة إلى تركيز عالى من البوتاسيوم أثر واضح فى تحسين نمو الكالس. وعموماً لوحظ أن البيئة المناسبة لمعظم الأغراض تحتوى على ٣٠ مول من النتروجين المعدنى والبوتاسيوم. وتستعمل أملاح الأمونيوم بتركيز ٢-٢٠ مليمول وهذا المدى الواسع من التركيز يكون مشجعاً للنمو أحيانا ومثبطا فى حالات أخرى. وغالباً يعتبر تركيز ١-٣ مليمول من أملاح الكالسيوم، السلفات، الفوسفات، الماغنسيوم مناسبة لمعظم الحالات. ويوضح جدول رقم (٢-٢٤) تركيب عدد من البيئات الشائعة الاستخدام فى زراعة الأنسجة وأشهرها Murashige & Skoog (MS) و Linsmair & Skoog’s (LS) و B5 و NN. إلا أنه من الصعب أن يوصى ببيئة واحدة لزراعة الأنسجة حيث يتوقف ذلك على النوع النباتى وعمر النبات والجزء المنزرع من النبات.

وأشار Rout *et al.* (1999) إلى نجاح الإكثار باستعمال بيئات أخرى مثل LS و Gamborg’s & Lee (GL) و Quorine Lepoivre (QL) و Woody plant medium (WPM). ووجد Carelli & Echeverrigaray (2002) أن لبيئة QL والتى تمتاز بتركيزها المنخفض من الأمونيا مع رفع تركيز الكالسيوم بالمقارنة مع MS أو B5 مع استبعاد الكلورين تأثير إيجابى فى الإكثار الدقيق للورد. حيث تعمل علي التغلب على أكسدة المواد الفينولية وبذلك ارتفعت نسبة الأجزاء النباتية التى حافظت على حيويتها من ٢٥-٤٥% إلى ٧٧.٥% مع رفع معدل التكشف. وتختلف الاستجابة لتركيز أملاح MS باختلاف الأصناف المختبرة فعلى الرغم من تفضيل استخدام تركيز منخفض من أملاح تلك البيئة للعديد من النباتات الخشبية فإن Bressan *et al.* (1982) أشار إلى أن ضعف نمو وكثرة التباين فى النباتات المستنسخة لبعض هجن الورد و

يرجع ذلك إلى التركيز المنخفض من الأملاح. والأكثر من ذلك تمكن Podwyszynska & Olszewski (1995) من معالجة إصفرار الأوراق والموت الموضعى للقمم النامية فى مزارع الأنسجة بمضاعفة تركيز الكالسيوم، كما حسن زيادة الكالسيوم والماغنسيوم والمنجنيز والحديد من نمو الأشطاء. وقد وجد تأثير أيجابى لنترات الفضة على سرعة ومعدل التكشف.

جدول ٢-٢٤: مكونات بعض البيئات شائعة الاستعمال في زراعة الأنسجة النباتيه.

المكون	البيئة						
	White[1]	Heller[2]	MS[3]	ER[4]	B[5]	Nitsch[6]	NT[7]
المركبات غير العضوية (مليجرام / لتر)							
NH_4NO_3	-	-	١٦٥٠	١٢٠٠	-	٧٢٠	٨٢٥
KNO_3	٨٠	-	١٩٠٠	١٩٠٠	٢٥٢٧,٥	٩٥٠	٩٥٠
$CaCl_2.2H_2O$	-	٧٥	٤٤٠	٤٤٠	١٥٠	-	٢٢٠
$CaCl_2$	-	-	-	-	-	١٦٦	-
$MgSo_4.7H_2O$	٧٥٠	٢٥٠	٣٧٠	٣٧٠	٢٤٦,٥	١٨٥	١٢٣٣
KH_2PO_4	-	-	١٧٠	٤٣٠	-	٦٨	٦٨٠
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	-	-	١٣٤	-	-
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	٣٠٠	-	-	-	-	-	-
$NaNO_3$	-	٦٠٠	-	-	-	-	-
Na_2SO_4	٢٠٠	-	-	-	-	-	-
$NaH_2PO_2.H_2O$	١٩	١٢٥	-	-	١٥٠	-	-

تابع جدول ٢-٢٤

KCl	٦٥	٧٥٠	-	-	-	-	-
KI	٠.٧٥	٠.٠١	٠.٨٣	-	٠.٧٥	-	٠.٨٣
H_3BO_3	١.٥	١	٦.٢	٠.٦٣	٣	١٠	٦.٢
$MnSo_4.4H_2O$	٥	٠.١	٢٢.٣	٢.٢٣	-	٢٥	٢٢.٣
$MnSo_4.H_2O$	-	-	-	-	١٠	-	-
$ZnSO_4.7H_2O$	٣	١	٨.٦	-	٢	١٠	-
$ZnSO_4.4H_2O$	-	-	-	-		-	٨.٦
$ZnNa_2.EDTA$	-	-	-	١٥		-	-
$Na_2MoO_4.2H_2O$	-	-	٠.٢٥	٠.٠٢٥	٠.٢٥	٠.٢٥	٠.٢٥
$CuSo_4.5H_2O$	٠.٠١	٠.٠٣	٠.٠٢٥	٠.٠٠٢٥	٠.٠٢٥	٠.٠٢٥	٠.٠٢٥
$CoCl_2.6H_2O$	-	-	٠.٠٢٥	٠.٠٠٢٥	٠.٠٢٥	-	-
$CoSO_4.7H_2O$	-	-	-	-	-	-	٠.٠٣
$FeCl_2.6H_2O$	-	١	-	-	-	-	-
$Fe_2(SO_4)_3$	٢.٥	-	-	-	-	-	-
$FeSO_4.7H_2O$	-	-	٢٧.٨	٢٧.٨	-	٢٧.٨	٢٧.٨
$Na_2.EDTA.H_2O$	-		٣٧.٣	٣٧.٣	-	٣٧.٣	٣٧.٣
Sequestrene 330Fe	-	-	-	-	٢٨	-	-

تابع جدول ٢-٢٤

المركبات العضوية (ميكروجرام / لتر)

Inositol	٠.٠٠٥	-	٠.٥	٠.٥	١	٥	-
Pyridoxine-HCl	٠.٠١	-	٠.١	٠.١	١٠	٠.٥	١
Thiamine-HCl	٣	-	٢	٢	-	٢	-
Glycine	-	-	-	-	-	٠.٥	-
Folic Acid	-	-	-	-	-	٠.٠٥	-
Biotin	-	-	-	-	-	-	١٢.٧
Sucrose	٢	-	%٣	%٤	%٢	%٢	%١

[1]White (1884), [2] Heller (1953), [3] Murashige and Skoog (1962), [4] Eriksson(1965), [5] Gamborg (1976), [6] Nitsch and Nitsch (1972), [7] Nagata and Takeba (1971).

بيئة Murashige & Skoog

كان Murashige طالبا فى معمل Skoog وكانت دراساته تنصب على نمو خلايا نخاع الدخان التى يستخدمها كطريقة للتقدير الحيوى للسيتوكينينات. وقد لاحظ أن إضافة المستخلص المائى لأوراق الدخان إلى بيئة White يشجع نمو مزارع النخاع بشكل ممتاز. وتوصل إلى أن ذلك راجعاً إلى العناصر المعدنية الموجودة بالمستخلص حيث حقق نفس النتيجة باستعمال الرماد المتبقى بعد حرق الأوراق (Vasil, 2008). وبعد هذه الملاحظات الأولية اعتمد هو واستاذه فى تحضير هذه البيئة على تحليل أنسجة النبات لتحديد التركيز الأمثل من العناصر المعدنية فى البيئة. وتعتبر هذه البيئة من أشهر البيئات استعمالاً فى مزارع الأنسجة حيث تمثل تقريباً ٢٥% من البيئات التى استعملت كما أن ٥٠% من النباتات التى نجحت زراعتها فى مزارع الأنسجة كانت باستخدام تلك البيئة (Leifert *et al.*, 1995). ويبين جدول رقم (٢-٢٥) تركيز العناصر الأساسية فى تلك البيئة ومتوسط تركيزها فى النباتات فى الظروف الطبيعية (Thorpe *et al.*, 2008).

جدول ٢-٢٥: مقارنة بين تركيز العناصر الأساسية فى بيئة MS وأنسجة الأفرع للنبات على أساس الوزن الجاف (Thorpe *et al*., 2008).

العنصر	فى النسيج (مليمول/كجم)	فى بيئة MS (مليمول/كجم)	% فى النسيج	% فى بيئة MS
N	١٠٠٠	٦٠	٦٤.٤	٦٤.٤
K	٢٥٠	٢٠	١٦.١	٢١.٣
Ca	١٢٥	٣	٨.٠	٣.٢
Mg	٨٠.١	١.٥	٥.١	١.٦
P	٦٠	١.٢٥	٣.٩	١.٣
S	٣٠	١.٥	١.٩	١.٦
Cl	٣	٦	٠.١٩	٦.٤
Fe	٢	٠.١	٠.١٣	٠.١١
Mn	١	٠.١	٠.٠٦	٠.١١
B	٢	٠.١	٠.١٣	٠.١١
Zn	٠.٣	٠.٠٣	٠.٠٢	٠.٠٣
Cu	٠.١	٠.٠٠٠١	٠.٠٠٦٠	٠.٠٠٠١
Mo	٠.٠٠١	٠.٠٠١	٠.٠٠٠١	٠.٠٠١١
Ni	٠.٠٠١	٠	٠.٠٠٠١	٠.٠٠٠٠

ويتضح ايضا التركيز المنخفض من الكالسيوم والفوسفور والماغنسيوم والنحاس وارتفاع تركيز الكلور والموليبدنيوم بالمقارنة مع أنسجة النبات. كما أن تركيز الأمونيا والنترات فيها أعلى خمس مرات من تلك التى كانت تستعمل سابقا بواسطة Meller. وكذلك فإن تركيز النتروجين الكلى أعلى عدة مرات من تركيز النتروجين الذى استعمل بواسطة Hildebrandt و White وأيضاً ارتفع تركيز البوتاسيوم فيها حوالى ١١ مرة أما الفوسفور فقد زاد تركيزه ١٣ مرة هذا بالإضافة لزيادة تركيز العناصر الصغرى. وكان لهذا التعديل الكبير أثراً واضحاً فى تحسين النمو والتكشف.

ورغم أن MS تم تركيبها لتلاءم نمو كالوس وأفرع نباتات الدخان إلا أنه ثبت نجاحها لعديد من النباتات الأخرى. ثم أعقب ذلك تحديث مكوناتها وكان معظم التغير فى تركيز أيون النترات والأمونيا والبوتاسيوم بينما لم يتغير تركيز معظم الأملاح الأخرى وبعد ذلك أضيفت الأحماض العضوية للبيئة بغرض تحسين النمو أو استعمالها كمضادات أكسدة. وبعد تلك التعديلات وجد أن مستوى الفوسفور منخفض ولا يلاءم عدد كبير من الأنواع النباتية الاخرى، لذا تم تعديل مكونات البيئة بعد ذلك برفع تركيز الفوسفور.

لكن يلاحظ ترسيب بعض العناصر مثل P و Ca و K و N و Zn و Mn فبعد سبعة أيام من تجهيز البيئة يلاحظ ترسب ٥٠% من الحديد و١٣% من الفوسفات، وقد يحدث الترسيب اثناء التعقيم مما يسبب خلل فى تركيب البيئة. لكن يلاحظ من مقارنة تركيز أملاح البيئات شائعة الاستعمال ارتفاع تركيز الأملاح فى بيئة MS. لذا استعمل الكثير من الباحثين تركيزات منخفضة من هذه البيئة فقام Pedraza-Santos *et al.* (2006) بزراعة مستأصلات من نبات *Alstroemeria* cv. 'Yellow King فى بيئة MS ونصف وربع تركيزها بغرض تكشف الأشطاء. وقد كان أعلى معدل لإنتاج الأشطاء عند استعمال نصف تركيز البيئة. لكن كان أطول الأشطاء عند استعمال ثلاثة أرباع التركيز. ولم يتأثر تكوين الجذور باختلاف تركيز الأملاح، وعلى العكس من ذلك أشار Mohamed *et al.* (2000) أن نصف تركيز أملاح MS أفضل من التركيز الكامل لتجذير أشطاء نباتات *Tagetes minuta*.

بيئة Gamborg (B5)

تم تركيب هذه البيئة بواسطة Gamborg (1976) لنمو معلق خلايا نبات *Glycine max* ويتضح أنها تحتوى على تركيز منخفض من NH_4^+ حيث يُثبط نمو الخلايا إذا احتوت البيئة على تركيز ٢ مليمول من NH^+_4. كما اختلف تركيز Ca^{2+}/Mg^{2+} ليتراوح بين ١ و٤ مليمول. وتعد بيئتى MS و B5 من أكثر البيئات

استعمالاً فى زراعة الأنسجة بنفس التركيب أو بعمل تحويرات قليلة فى محتوياتهما. ومن المهم التأكيد على أن تركيز الأيونات المختلفة فى البيئة له نفس أهميه نسبة هذه الأيونات لبعضها البعض بالإضافة للتركيز الكلى من الأيونات. كما إن امتصاص الأيونات المعدنية يتوقف على نسبة سطح المُستأصَل النباتى الملامس للبيئة إلى السطح الكلى وما إذا كانت البيئة سائلة أو صلبة. فالجزء الكبير نسبياً من الكالس تكون نسبة سطحه الملامس للبيئة صغيرة بالمقارنة مع حجمه الكلى. وضبط تركيز الأيونات يصبح أكثر أهمية عندما يكون أيون ما مثبط للنمو أو لإحدى العمليات الفسيولوجية لنوع نباتى معين، فعلى سبيل المثال الأنواع الخشبية تنمو بدرجة أحسن عندما يكون تركيز الأملاح الكلى فى بيئة MS منخفض لذا يفضل استخدام نصف التركيز. وقد يتحسن النمو عند خفض أيون معين أو أكثر لكن بالطبع يكون هذا محل تجريب لكل نوع نباتى على حده.

اختيار البيئة المناسبة

يتم اختيار البيئة اعتماداً على نوع النبات ومن البديهى أن نستخدم نفس البيئة التى ثبت نجاحها لزراعة نفس الصنف أو البيئة التى ثبت نجاحها مع الأصناف ذات القرابة الوراثية الشديدة. ثم يتم التدريج فى استخدام البيئات التى استعملت مع نباتات أخرى من نفس النوع ثم الجنس ثم نفس العائلة ويمكن تحوير مكونات البيئة لتلاءم عمليات التكشف والنمو المختلفة، لكن يجب التنويه إلى أن النمو الأمثل يمكن تحقيقه باستخدام بيئات مختلفة. ومن ثم يمكن محاولة تطوير البيئة التى ثبت نجاحها مع نبات ما لتلاءم نبات آخر. وفى حالة عدم توفر معلومات سابقة عن أنسب بيئة يمكن استخدامها، يتم تجريب التوليفات المشهورة من العناصر الكبرى ولعل استخدام العناصر الكبرى فى بيئة MS أو نصف تركيزها مع واحدة أو اثنتين من البيئات الأخرى مناسب لدراسة معظم الأنواع مع ضرورة استخدام نفس التركيز من العناصر

الصغرى والفيتامينات ومنظمات النمو وكذلك السكر. وبعد تحديد أفضل هذه البيئات يمكن البدء فى تغيير تركيز الأمونيا والنترات مع أيونات العناصر الأخرى كالسلفات والفوسفات ويفضل دراسة ثلاث مستويات لكلاً من هذه الأيونات مع ضرورة تكرار كل معاملة أربع مرات.

إعداد البيئة

يمكن شراء البيئات المختلفة المستخدمة فى زراعة الأنسجة جاهزة فى صورة مسحوق يحتوى على كل العناصر والإضافات المختلفة عدا السكر. وتوجد هذه المستحضرات فى عبوات تكفى الواحدة لتحضير ١، ٥، ١٠، ٥٠، ١٠٠ لتر. كما يمكن شراء بعض المكونات مثل العناصر الصغرى أو الكبرى أو فيتامينات إحدى البيئات مثل العناصر الصغرى لـ B5 وفى معظم الحالات يكون هذا النوع من البيئات غير اقتصادى فى الإنتاج التجارى لارتفاع ثمنه. وعند تحضير البيئة معملياً يجب ملاحظة ما يأتى:

١. استعمال كيماويات عالية النقاوة ويفضل شراء الكيماويات فى عبوات قليلة الوزن ما أمكن حتى لا تفسد بالتميؤ أو التلوث بكيماويات أخرى.
٢. البيئة الجاهزة لا تتكون من نفس الأملاح المكونة للبيئة عند تجهيزها معملياً. بمعنى أنه يمكن أن تحتوى البيئة على نفس تركيز أيونات الكالسيوم مثلاً لكن باستخدام أملاح مختلفة.
٣. يراعى أن يتم استخدام زجاجيات نظيفة جداً وتعقيم الأوعية المستخدمة للزراعة تعقيماً رطباً إذا كانت تحتوى على بيئة سابقه قبل استعمالها للزراعة.
٤. تغطية الأوعية والزجاجات بمجرد غسلها وبعد تجفيفها حتى لا تتلوث بالغبار ويستحسن عدم تخزين الأدوات لمدة طويلة بعد غسلها.
٥. يمكن أن تخزن البيئة بعد تحضيرها لعدة أسابيع على درجة حرارة ٤-١٠ °م أما التخزين فى درجة حرارة عالية فإنه يؤدى إلى تبخير الماء وبالتالى يختل تركيز المركبات المختلفة.

ويتم تجهيز البيئة بإذابة الأملاح فى الماء ثم ضبط الرقم الهيدروجينى للمحلول وإضافة الآجار وبعد ذلك تصب فى الأوعية الخاصة بالزراعة ثم تعقم. وفى بعض الأحيان يفضل تعقيم البيئة فى كميات كبيرة قبل توزيعها لتلافى حدوث تغير فى الآجار والسكر عند تعقيم كميات قليلة خصوصاً إذا كان الرقم الهيدروجينى منخفض. وإذا كانت البيئة تحتوى على أحد المواد ذات الثبات الحرارى المنخفض كبعض الهرمونات والمضادات الحيوية والإنزيمات فإنها تعقم باستعمال مرشحات ذات اقطار ٠.٤٥ ميكرون ثم تضاف للبيئة المعقمة قبل صبها مباشرة (درجة الحرارة ٤٠°م. ولضمان الإعداد الجيد للبيئة يوصى بأخذ الاحتياطات الآتية:

١. يراعى الدقة فى قياس المحاليل ووزن الكيماويات وعدم تلوث بعضها ببعض ويفضل تخصيص ملعقة لكل نوع من الكيماويات المستعملة لتلافى التلوث.
٢. إذا حفظت بعض محاليل الأساس كالفيتامينات فى المجمد فيجب حفظها فى كميات صغيرة تكفى ١-١٠ لتر حتى لا نضطر إلى إذابة المحلول ثم تجميده عند كل تحضير.
٣. بعد تجهيز البيئة يتم ضبط الرقم الهيدروجينى قبل التعقيم مباشرة.
٤. إذا كانت البيئة المستعملة سائلة يستحسن أن يخفض الرقم الهيدروجينى حتى تقلل من ترسيب الأيونات. كما أن انخفاض الرقم الهيدروجينى يقلل من تلوث المزرعة وحيث أن الرقم الهيدروجينى ينخفض أثناء التعقيم فإنه يفضل ضبط الرقم الهيدروجينى على ٦ حتى يصل إلى ٥.٧-٥.٩ بعد التعقيم لكن يلاحظ أن ارتفاع الرقم الهيدروجينى عن ٧-٨ يؤدى إلى ترسيب أيونات الكالسيوم. وهناك طريقة أخرى لضبط الرقم الهيدروجينى بعد التعقيم وإن كانت صعبة من الناحية العملية. فبعد تحضير البيئة يتم ضبط الرقم الهيدروجينى على ٦ ثم يؤخذ جزء صغير وليكن ١٠٠ مل مثلاً ويعقم منفرداً. وبعد التعقيم يعاد ضبط الرقم الهيدروجينى لهذا الجزء ويتم حساب كمية NaOH أو HCl اللازمة لتعديل الرقم الهيدروجينى للبيئة ويتم أضافه هذه الكميه بعد تعقيمها بالترشيح إلى البيئة تحت ظروف تعقيم.

٥. بعد تجهيز البيئة يجب عدم تخزينها مدة طويلة قبل التعقيم حتى لا تنمو عليها الكائنات الدقيقة وبالتالى تغير من المحتوى الكيماوى لها، وقد تفرز بها بعض السموم.
٦. يجب حفظ البيئة بمجرد إعدادها وتعقيمها فى مكان مظلم على درجة حرارة ٥°م لمنع البخر.
٧. قد يحدث تلوث للبيئة بعد التعقيم أو لمحاليل الأساس وفى هذه الحالة يجب عدم استعمالها وتعقيمها قبل التخلص منها. ويعرف التلوث الحادث فى المحلول بعدة صفات حسب نوع التلوث فالخمائر تعطى المحلول لون يشبه اللبن أما الفطريات فتتميز بوجود الهيفات. وإن كانت البيئة سائلة وموجودة على هزاز نلاحظ تكوين كرات من الفطر أما التلوث البكتيرى فيلاحظ بوجود عكارة ورائحة تميز بعض الأجناس المختلفة من البكتريا.

وقد اقترح Gamber أهمية إضافة الأملاح للماء كما هو وارد فى ترتيب مكونات البيئة وذلك لتفادى ترسيب بعض الأملاح فمثلاً يضاف النتروجين المعدنى أولاً حتى لا تترسب أملاح الفوسفات والكالسيوم. لكن لما كان تركيز الأملاح المستعمل لتجهيز البيئة منخفض جداً ومن الصعب الحصول على هذه الأوزان بدقة فإنه يفضل عمل محاليل مركزة والتى تعرف بمحاليل الأساس لواحد أو عدد من الأملاح ثم تخفف للحصول على التركيز النهائى ويوفر ذلك كثيراً من الوقت. وفى الغالب يكون تركيز محاليل الأساس ١٠-٢٠ مرة أعلى من التركيز النهائى، ويتم إعداد المحاليل الأساسية الآتية:

١. العناصر الكبرى بتركيز ١٠ أضعاف التركيز النهائى ويمكن حفظ هذا المحلول بالثلاجة لمدة طويلة كما يمكن حفظها مجمداً أيضاً. لكن يفضل إذابة تلك الأملاح مباشرة عند التحضير.
٢. العناصر الصغرى عدا الحديد يتم إعداد محلول منها تركيزه ١٠ أو ١٠٠ مرة ضعف التركيز النهائى ويحفظ بالثلاجة.
٣. الحديد يتم إعداد محلول بإذابة ٢.٧٨ جم من كبريتات الحديدوز $FeSO_4.7H_2O$ و٣.٧٣ جم من $Na_2EDTA.7H_2O$ فى ١٠٠٠ مل ماء ليعطى محلول تركيزه ١٠٠ مرة أعلى من تركيز الحديد فى MS ويحفظ فى الثلاجة.

٤. الفيتامينات والأحماض الأمينية يتم إعداد محلول الأساس منها بتركيز ١٠٠- ١٠٠٠ مرة أعلى من التركيز فى المحلول النهائى وتحفظ فى المجمد على درجة -٤ °م.

٥. يتم إعداد محلول الأساس من منظمات النمو المختلفة بحيث يكون تركيزه ١٠٠ مرة ضعف تركيزه فى المحلول النهائى ويحفظ بالثلاجة. ويوضح جدول رقم (٢-٢٦) طريقة تحضير محلول قياسى قوته مليمول واحد من منظمات النمو المختلفة، ويمكن الأستعانة بجدول رقم (٢-٢٧) لتحويل الوزن بالجرام إلى مول.

٦. عند تحضير حجم معين من البيئة يتم إضافة القدر اللازم من هذه المحاليل إلى كمية من الماء تقل قليلاً عن الحجم النهائى ثم يضاف السكر ويكمل الحجم ويضبط الرقم الهيدروجينى.

وفيما يلى إحدى الطرق الموصى بها لتحضير ١ لتر من بيئة MS .

١. تذاب الكميات آلاتية فى ١٠٠ مل ماء مقطر لتحضير محلول أساس (أ) تركيزه ١٠٠ مره التركيز النهائى

$MnSO_4.4H_2O$	٢٢٣٠ ملجم
ZnSO4.7H2O	٨٦٠ ملجم
H3 BO3	٦٢٠ ملجم
KI	٨٣ ملجم
$Na_2MoO_4.2H_2O$	٢٥ ملجم
$CuSO_4.5H_2O$	٢.٥ ملجم
$CoCl_2.6H_2O$	٢.٥ ملجم

٢. تذاب الكميات الآتية فى ١٠٠ مل ماء مقطر لتحضير محلول أساس (ب) تركيزه ١٠٠ مرة التركيز النهائى

FeSO4. 7H2O	٢٨٧ ملجم
$Na_2EDTA.2H_2O$	٢٣٧ ملجم

٣. تذاب الكميات الآتية فى ١٠٠ مل ماء مقطر لتحضير محلول أساس (ج) تركيزه ١٠٠ مرة قدر التركيز النهائى

Glycine	٢٠٠ ملجم

Nicotinic acid	٥٠ ملجم
Pyridoxine-HCl	٥٠ ملجم
Thiamine-HCl	١٠ ملجم

٤. تذاب الكميات آلاتية فى ٥٠٠ مل ماء مقطر

NH_4NO_3	١٦٥٠ ملجم
KNO_3	١٩٠٠ ملجم
$MgSo_4.7H_2O$	٧٣٠ ملجم
KH_2PO4	١٧٠ ملجم
$CaCl_2.2H_2O$	٤٤ ملجم

٥. أضف للمحلول السابق ١٠٠ مليجرام ميوانوزيتول.

٦. أضف ١٠ مل من المحلول (أ) و١٠ مل من المحلول (ب) و١٠ مل من المحلول (ج).

٧. أضف ٣٠ جم من السكر.

٨. اكمل الحجم إلى ٩٠٠ مل واضبط الرقم الهيدروجينى ثم اكمل الحجم إلى الحجم النهائى باستعمال كأس مدرج أو دورق معيارى.

٩. أضف المادة المصلبة اللازمة إلى دورق ثم صب الكمية المحددة من البيئة. يلاحظ أن الوعاء المحتوى على البيئة لا يكون ممتلئ حتى لا يحدث فوران أثناء التعقيم.

١٠. عقم البيئة بجهاز التعقيم الرطب على درجة ١٢١ °م لمدة ١٥-٢٠ دقيقة.

١١. اترك البيئة لتبرد فى حمام مائى إلى درجة ٤٠-٥٠°م ثم صبها فى أوانى الزراعة بالكمية المناسبة.

١٢. المواد ذات الثابت الحرارى المنخفض تعقم بالترشيح وتضاف قبل صب البيئة فى أوانى الزراعة.

جدول ٢-٢٦: طريقة تحضير المحلول القياسى ١ مليمول من بعض منظمات النمو.

المركب	ملجم/١٠٠ مل	الذوبان	التخزين: المركب	التخزين: المحلول	التركيز الشائع
الأوكسينات					
2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-	٢٢.١	كحول NaOH	الغرفة	صفر-٥	٠.٠١-٥.٠
Indole-3-acetic acid (IAA)	١٧.٥		صفر		٠.٠١-٣.٠
Indole-3-butric acid (IBA0	٢٠.٣٢	NaOH	صفر-٥	صفر	٠.١-١٠
α- Naphthalene acetic acid	١٨.٦٢	NaOH	الغرفة	صفر-٥	٠.١-١٠
β- Naphthoxy acetic acid	٢٠.٣٢	NaOH			٠.١-١٠
2,4,5-Trichlorophenoxy acetic acid (2,4,5-	٢٥.٥٦	NaOH			٠.٠١-٦
Prcloram (PIC)	٢٤.١٢	DMSO	الغرفة	صفر-٥	٠.١-١٠
السيتوكينيات					
Adenin (Ade)	١٣.٥	ماء			٥٠-٢٥٠
Benzyl adenine or benzyl amino purine (BA,	٢٥.٢٢	NaOH	الغرفه	صفر-٥	٠.١-٥.٠
N-isopentenylamino purine (2iP)	٢٠.٣٣	NaOH	-٢٠-صفر		١-٣٠
Kinetin (KIN)	٢١.٥٢	NaOH	الغرفه		١- ٥
Zeatin (ZEA)	٢١.٩٢	NaOH	الغرفه		٠.٠١-٥.٠
المركبات الأخرى					
Gibberellic acid (GA3)	٢٦.٤٣	كحول	الغرفة	صفر-٥	٠.١-٥.٠
Abscisic acid (ABA)	٣٩.٩٤	NaOH	-٢٠-صفر	صفر	٠.١-١٠

جدول ٢-٢٧: تحويل تركيز منظمات النمو من ملجم/لتر إلى ميكرومول.

التركيز	المركب ووزنه الجزئي/ التركيز (ميكرومول)									
	BA	2ip	2,4-D	GA_3	IAA	IBA	Kin	NAA	TDZ	Zeatin
(ملجم/لتر)	٢٢٥.٣	٢٠٣.٢	٢٢١.٠	٣٤٦.٤	١٧٥.٢	٢٠٣.٢	٢١٥.٢	١٨٦.٢	٢٢٠.٠	٢١٩.٢
١	٤.٤٤	٤.٩٢	٤.٥٢	٢.٨٩	٥.٧١	٤.٩٠	٤.٦٥	٥.٣٧	٤.٥٤	٤.٥٦
٢	٨.٨٨	٩.٨٤	٩.٠٥	٥.٧٨	١١.٤٢	٩.٨٠	٩.٣٠	١٠.٧٤	٩.٠٨	٩.١٢
٣	١٣.٣٢	١٤.٨٠	١٨.١٠	٨.٦٧	١٧.١٣	١٤.٧٠	١٣.٩٥	١٦.١١	١٣.٦٢	١٣.٦٨
٤	١٧.٧٦	١٩.٦٨	١٨.٠٨	١١.٥٦	٢٢.٨٤	١٩.٦٠	١٨.٦٠	٢١.٤٨	١٨.١٦	١٨.٢٤
٥	٢٢.٢٠	٢٤.٦١	٢٢.٦٠	١٤.٤٥	٢٨.٥٥	٢٤.٥٠	٢٣.٢٥	٢٦.٨٥	٢٢.٧٠	٢٢.٨٠
٦	٢٦.٦٤	٢٩.٥٢	٢٧.١٢	١٧.٣٤	٣٤.٢٦	٢٩.٤٠	٢٧.٩٠	٣٢.٢٢	٢٧.٢٤	٢٧.٣٦
٧	٣٠.٠٨	٣٤.٤٤	٣١.٦٤	٢٠.٢٣	٣٩.٩٧	٣٤.٣٠	٣٢.٥٥	٣٧.٥٩	٣١.٧٨	٣١.٩٢
٨	٣٥.٤٢	٣٩.٣٦	٣٦.١٦	٢٣.١٢	٤٥.٦٨	٣٩.٢٠	٣٧.٢٠	٤٢.٩٦	٣٦.٣٢	٣٦.٤٨
٩	٣٩.٩٦	٤٤.٢٨	٤٠.٦٨	٢٦.٠١	٥١.٣٩	٤٤.١٠	٤١.٨٥	٤٨.٣٣	٤٠.٨٦	٤١.٠٤
١٠	٤٤.٤٠	٤٩.٢١	٤٥.٢٠	٢٨.٩٠	٥٧.١٠	٤٩.٠٠	٤٦.٥٠	٥٣.٧٠	٤٥.٤٠	٤٥.٦٠

الـفـصـل الـثـالـث

منظمات النمو النباتية ودورها فى زراعة الأنسجة

على عكس الحيوانات لا تمتلك النباتات جهاز حركى يمكنها من الإبتعاد عن عوامل الإجهاد البيئية. ويطلق على المركبات التى تقوم بدور الإشارات البيئية مصطلح الهرمونات النباتية plant hormones أو مواد النموالنباتية plant growth substances وهى مجموعة من المركبات العضوية الموجودة طبيعياً بالنبات والتى لا تلعب دوراً مغذياً بل تتحكم مباشرة وبتركيزات منخفضة للغاية فى آليات النمو والتطور. أما المركبات المصنعة معملياً والتى تحاكى التأثيرات الفسيولوجية لهذه المركبات فإنها تسمى منظمات النمو النباتية plant growth regulators. ولا يتوقف دور منظمات النمو على توجيهه الخلية للاستجابة للمؤثرات الخارجية فحسب بل من المؤكد أنها تلعب دوراً محورياً فى دورة حياة الخلية نفسها وانتقالها من مرحلة تلو أخرى سواء فى مزارع الأنسجة أو على مستوى النبات الكامل، لكن يجب التأكيد على أن هذه المركبات لا تعد مواد مغذية (Francis & Sorrell, 2001).

وتختلف منظمات النمو النباتية عن تلك الحيوانية فى المدى الواسع من تأثيراتها الفسيولوجية على عمليات التطور التى ترتبط فى نفس الوقت بالنوع النباتى. وكثيراً ما يلاحظ تأثير مساعد أو متعارض لمركبين مختلفين من منظمات النمو فى بعض الحالات. كما يتأثير الفعل الوظيفى لمنظمات النمو بالعوامل البيئية المختلفة، ومن ثم يصبح من الصعب تحديد مدى وكيفية استجابة نبات ما أو بالأحرى عضو معين فى النبات لمنظم نمو. وتم تقسيم هذه المواد إلى عدة مجموعات على أساس تأثيرها الوظيفى وهى تضم الأوكسينات، والسيتوكينينات، والجبريلينات، وغاز الإثيلين. وتعتبر الأوكسينات والسيتوكينينات من أكثر منظمات النمو تحكماً فى النمو والتكشف فى مزارع الأنسجة. أما الجبريلينات وحامض الأبسيسك فيندر استعمالهما فى زراعة الأنسجة ولم يتم

تصنيعهما معمليا بصورة تجارية حتى الآن ويعتمد على المصادر الطبيعية فى الحصول عليهما. وبالرغم من ذلك فإن هناك العديد من المركبات المصنعة معمليا والتى تعيق فعل الجبريلينات وتسمى بمضادات الجبريلينات أو معوقات النمو growth retardants. أما غازى الاستيلين والبروبلين فلهما تأثير يحاكى الإثيلين لكن يجب إضافتهما بتركيزات كبيرة لإحداث نفس التأثير الوظيفى. ورغم إمكانية استعمال الإثيلين كمنظم نمو إلا أن صعوبة التحكم فى إضافته وتركيزه والذى يتطلب أوعية محكمة الغلق تحد من استعماله فى زراعة الأنسجة. لكن تضاف بعض المركبات التى ينتج عنها الإثيلين، كذلك هناك بعض المركبات مثل ethephon (2-chlorethanephosphonic acid) التى يمتصها النبات ثم يحدث لها تحلل داخلى وينتج منها غاز الإثيلين (Machkova *et al.*, 2008).

التأثير الوظيفى لمنظمات النمو فى مزارع الأنسجة

إن تأثير منظمات النمو فى مزارع الأنسجة ليس مطلقاً فاستجابة المُستأصل النباتى تتوقف على عدة عوامل منها نوع النبات ونوع النسيج وعمره وباقى الظروف المتعلقة بمكونات البيئة والظروف البيئية والتى سيتم تناولها بالتفصيل فى الفصل التالى. كما أن هناك مدة زمنية عقب المعاملة لملاحظة أثر منظمات النمو المضافة، وقد يمتد هذا التأثير الوظيفى حتى بعد خلو البيئة منه بل وإلى النباتات الناتجة التى تم نقلها للحقل. فعلى سبيل المثال ترجع زيادة تفرع بعض النباتات كالجربيرا بعد أقلمتها ونقلها من المعمل إلى التأثير المتبقى للسيتوكينينات المضافة سابقاً لبيئة الإكثار. ويتم تنظيم النمو والتكشف فى مزارع الأنسجة عن طريق التداخل والاتزان بين منظمات النمو المضافة للبيئة وتلك الموجودة طبيعياً فى النسيج. فقد تعمل بعض منظمات النمو المضافة خارجياً على تحوير المستوى الداخلى للهرمونات بطريقة قد تمتد إلى أكثر من جيل خلوى. ويعتقد أن تأثير كثير من منظمات النمو يكون بطريقة غير مباشرة بتأثيرها على مستوى منظمات النمو الداخلية. وربما يكون تأثير منظمات النمو على التكشف فى مزارع

لأنسجة مرتبطاً بدورها فى التحكم فى انقسام وتكشف الخلية باعتبارها هى المحدد لإنتقال الخلية من مرحلة إلى أخرى أثناء دورة الخلية، وبالتالى توجية الخلية نحو التكشف بالإضافة إلى التحوير فى اتجاة الانابيب الدقيقة. وتأكد ذلك بدراسة التغيير فى اتجاة الألياف الدقيقة المكونة للجدار الخلوى فى الخلايا أثناء تكشف الأوراق منها. وبزيادة مطاطية الجدر الخلوية وتغيير توجيه الالياف الدقيقة بها تتكون نتوات على السطح هى بمثابة منشأ العضو الجديد وبالطبع لا بد وان يقترن ذلك بعملية الانقسام الخلوي (Francis & Sorrell, 2001).

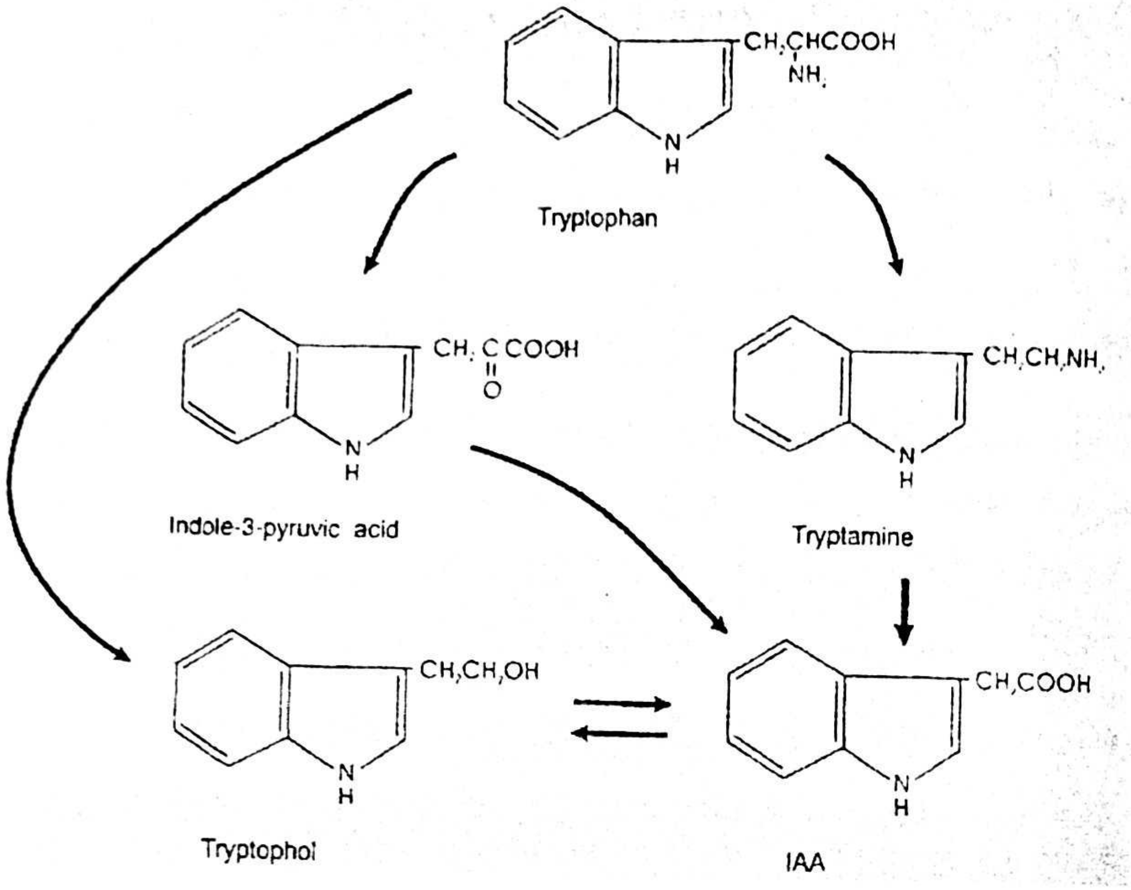
أولاً: الأوكسينات Auxins

تستعمل الأوكسينات بصورة كبيرة فى مزارع الأنسجة فربما لا تخلو طريقة إكثار نبات ما -على الاقل فى إحدى مراحل الإكثار- من أحد الأوكسينات. وكلمة أوكسين Auxin مشتقة من الكلمة اليونانية Auxein والتى تعنى النمو، وذلك لتأثيره الواضح فى نمو النباتات واستطالتها. وهذه المجموعة من منظمات النمو يتم تخليقها حيوياً فى القمم النامية للنبات ثم تتحرك حركة قطبية لباقى الأجزاء. ويطلق على الهرمون اسم اكسين لو كان له القدرة على التحكم فى عمليات محددة من النمو والتكشف كانقسام واستطالة الخلايا (Cleland, 2004)، كما تتحكم الأوكسينات فى السيادة القمية وعمليات الإنتحاء الضوئى. وفى مزارع الأنسجة يترتب على ذلك نشوء القمم الميرستيمية التى يمكن أن تتكشف إلى أعضاء نباتية أو كالوس وتمتاز الأوكسينات الطبيعية والمخلقة بوزنها الجزيئ المنخفض واحتوائها على حلقة اندول أو حلقة عطرية. وهى عبارة عن بلورات تذوب بدرجة خفيفة فى الماء لكنها تذوب جيداً فى المذيبات العضوية كالميثانول والإيثانول والاسيتون أو فى الأحماض والقلويات الضعيفة. ويرجع اكتشاف الأوكسينات إلى العالم Went فى سنة ١٩٢٦ وبعد الإشارة الأولية لتلك المركبات التى تسبب إنحناء غمد ريشة الشوفان نحو الضوء على يد Boysen-Jensen فى عام ١٩١٠ توالت

الأبحاث نحو عزل هذه المادة وتعريفها محاولة ايجاد مشابهات معملية لها. وقد عرف أثر ذلك أن هذا المادة عبارة عن بلورات بيضاء اطلق عليها أندول حامض الخليك IAA ويتم تصنيعه من الحامض الأمينى التربتوفان (Manly *et al.*, 2004) كما هو موضح فى شكل رقم (٣-١)

ويتم ذلك فى القمم النامية لكل من المجموع الخضرى والجذرى كذلك البراعم الطرفية والبراعم الزهرية والأوراق حديثة التكوين وأعناقها. لكن على العكس من اشارة العديد من الدراسات إلى تخليق IAA فى القمم النامية يعتقد Baker (2000) أن القمم النامية هى مكان لتجميع IAA الذى يخلق فى الأوراق البالغة. وأمكن التعرف على بعض المركبات الطبيعية التى لها تأثير مشابه لأندول حامض الخليك مثل فينايل حامض الخليك. وحيث أنتخليق IAA داخل النبات يتم من حامض التربتوفان فإن هذا الحامض يلعب دوراً مشابهاً للأوكسين فى بعض مزارع الأنسجة.

ويتوقف تركيز IAA فى المُستأصَل النباتى على تركيزه فى النبات الأصل وعمرها وموسم النمو وظروف النمو المختلفة. وفى الأنسجة المتكشفة تلعب الأوكسينات دوراًمحورياً فى السيادة القمية والتى يجب كسرها فى بعض أنواع مزارع الأنسجة. ويعتبر Davies (2004) من أفضل المراجع من حيث تاريخ اكتشاف منظمات النمو ودورها فى النبات بشكل عام. تستخدم الأوكسينات فى تشجيع نمو الكالس والخلايا فى المعلق الخلوى وكذلك الأعضاء فى مزارع الأنسجة كما تعمل على تنظيم عمليات التكشف وخاصة عند إضافتها مع السيتوكينينات. حيث تستحث الأوكسينات انقسام الخلايا وبدء تكوين مراكز ميرستيمة فى مزارع الأنسجة والتى يمكن تكشفها فيما بعد (Razdan, 2002). ووجود تلك المناطق الميرستيمية يشجع من سرعة النمو باعتبار أن هذه المناطق مراكز لتصنيع IAA، لدرجة أن بعض الأنسجة والأعضاء المنزرعة يمكنها النمو دون إضافة اكسين خارجى اعتماداً على مقدرتها على تصنيعه ذاتياً وتسمى هذه الأنسجة auxin habituated أى ذاتية الأوكسين.



شكل ٣-١: مراحل التخليق الحيوى لأندول حامض الخليك (Davies, 2004).

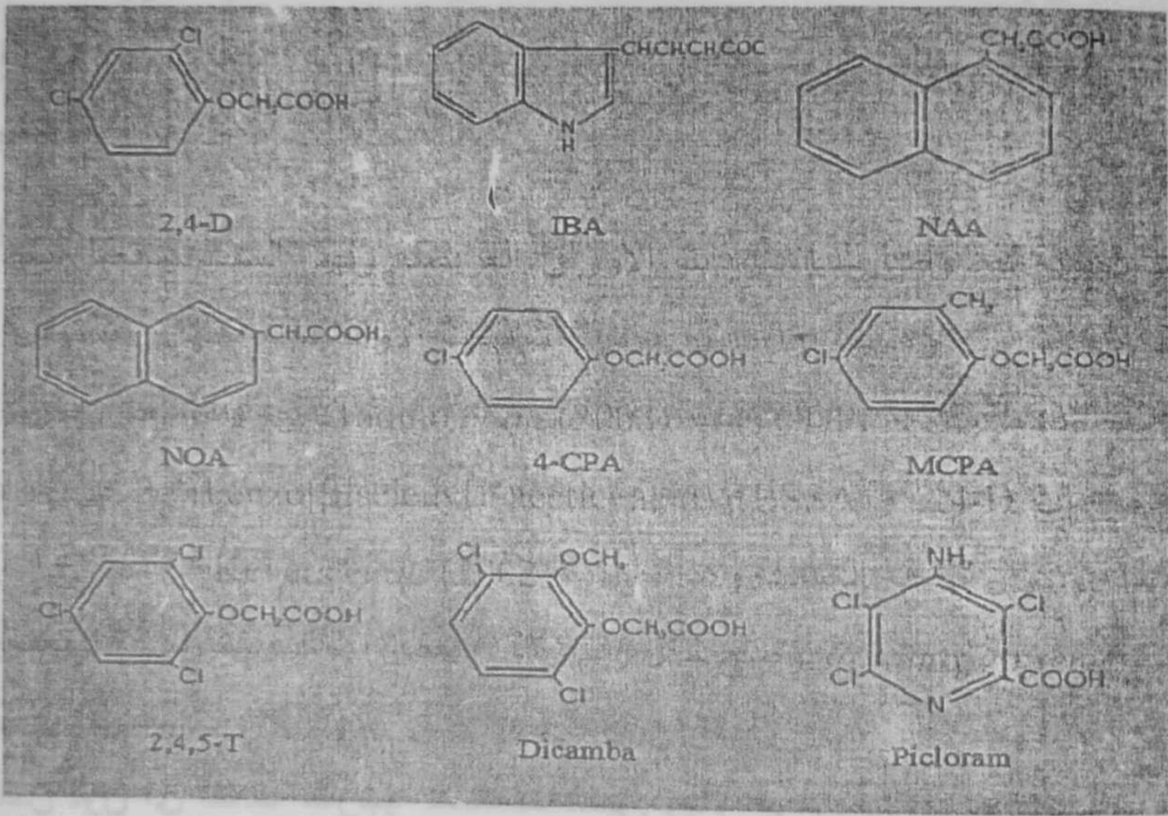
كذلك تبرز أهمية الأوكسين فى مراحل تكوين الجذور على النباتات المتكشفة فى مزارع الأنسجة، لكن لابد من تحديد توقيت المعاملة فاستحثاث تكوين الجذور يتم فى وجود الأوكسين لكن ربما يتطلب الأمر إزالة الأوكسين كلياً أو خفض تركيزه فى بيئة نمو الجذور(Pierik, 1987). وتتوقف نوعية الأوكسينات المضافة وكذلك تركيزها على النوع النباتى ونوع النسيج ومحتواه الطبيعى من الأوكسين وقدرة هذا الجزء على تصنيع الأوكسين، وبالطبع يعتبر نوع النمو والتكشف المراد إحداثه عاملاً محدداً لنوع وتركيز الأوكسينات المضافة للمزرعة. وسيتم الاعتماد فى دراسة دور الأوكسينات فى مزارع الأنسجة على Machkova *et al.*(2008) والذى قام بتقديم عرض موسع جداً عن الدراسات السابقة فى هذا الصدد.

الأوكسينات المصنعة معملياً

على العكس من الأوكسينات المخلقة التى تتسم بالثبات يحدث تكسير سريع لـ IAA الطبيعى المضاف إلى وسط النمو وكذلك داخل الأنسجة المنزرعة عقب امتصاصه. وربما يكون هذا الهدم سواء داخل الأنسجة أو بالانخفاض التدريجى للتركيز فى الوسط الخارجى ضرورياً لإحداث التكشف فى حد ذاته، ويفسر ذلك باختلاف تأثير الأوكسين على المراحل المختلفة أثناء التكشف. لذا قد ينصح بإضافة IAA مع أحد الأوكسينات المصنعة للحصول على نتائج أفضل. وهناك العديد من المركبات المصنعة معملياً تحاكى الأثر الوظيفى لـIAA، وأكثر الأوكسينات المصنعة والمستعملة فى زراعة الأنسجة هى 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) والذى شاع استخدامه فى إنتاج الكالس والمعلق الخلوى لفترات طويلة، لكن قل استعماله حديثاً بعد اكتشاف شدة التغيرات الوراثية التى يسببها وحل محله مركبى 3-indolebutyric acid (IBA) و1-naphthalene acetic acid (NAA) وهناك بعض الأوكسينات الأقل استخداماً فى مزارع الأنسجة مثل 4-chlorophenoxy acetic acid or *p*- chlorophenoxy acetic acid (4-CPA) و 2-naphthyloxyacetic acid (NOA). كما يندر استعمال مركب 2,4,6-trichlorophenoxy acetic acid (2,4,6-T) ويقتصر استخدامه على إنتاج الكالس والتكشف غير المباشر للأجنة الجسدية فى النباتات أحادية الفلقة كالأرز. ومن الأوكسينات المصنعة أيضاً مركب 3,6-dichloroanisic acid (Dicamba) والذى يستعمل غالباً لإنتاج الكالس المكون لأجنة جسدية فى النباتات أحادية الفلقة، وقد يؤدى نفس الدور فى النباتات ثنائية الفلقة أيضاً.

ويجب الإشارة إلى أن التركيزات العالية نسبياً من معظم الأوكسينات على وجه الخصوص 2,4-D و Dicamba و 2,4,5-T و 4-amino-3,5,6-trichloropcolinic acid (Picloram) و 2-methyl-4- chlorophenoxyacetic acid (MCPA) لها

سمية حيوية خصوصاً للنباتات ذات الأوراق العريضة ولهذا السبب يستعمل بعضها كمبيدات حشائش. وهناك أنواع أخرى من مشابهات الأوكسينات لكنها لا تستعمل فى زراعة الأنسجة مثل CDPPN ويشير Tadino *et al.* (2003) إلى كفاءة بعض المركبات الحديثة مثل 2,4-D و(BSSA) (benzo[β]selenyl) acetic acid -3 فى مزارع الأنسجة وتكوين الأجنة الجسدية وهذا ما أكده Kevers *et al.* (2002) فى مزارع أنسجة نباتات *Panax ginseng*. ويوضح شكل رقم (٣-٢) بعض الأوكسينات الشائع استعمالها.



شكل ٣-٢: بعض الأوكسينات المصنعة معملياً والمستعملة فى زراعة الأنسجة.

ثبات الأوكسينات فى مزارع الأنسجة

على العكس من باقى الأوكسينات يتصف IAA و IBA بالحساسية للحرارة والتحلل الجزيئ عند التعقيم الحرارى. ولا يتوقف الأمر عند ذلك حيث يعتبر IAA غير ثابت فى المزرعة حتى لو تم إضافته بعد تعقيم البيئة بالترشيح، وينخفض تركيزه فى بيئة

MS بمقدار ٩٠% بعد أربعة أسابيع فى الظلام وبدون وضع أى أنسجة فى البيئة. ويزيد تركيز الأملاح والضوء من سرعة التحلل، كما يزيد معدل الهدم فى البيئة السائلة بالمقارنة مع الشبه صلبة. وفى قياس لبيئة MS السائلة على درجة حرارة ٢٥ °م و١٦/٨ ساعة ضوء/ظلام سجل انخفاض فى تركيز IAA من ١.٧٢ ملجم/لتر إلى أقل من ٠.٠٥ ملجم/لتر بعد ١٤ يوم من الزراعة (Nissen & Sutter, 1988). أماIBA فكان أكثر ثباتاً من IAA وانخفض تركيزه إلى ٧٥% فقط بعد ٣٠ يوم فى الظلام و ٤٠% بعد ٣٠ يوم تحت ظروف الإضاءة السابقة. ويعتبر كلاً منNAA و 2,4-D من أكثر الأوكسينات ثباتاً فى بيئات زراعة الأنسجة، لكنهما يرتبطان مع مركبات آخرى وكذلك يتحللان نتيجة الفعل الأنزيمى داخل الأنسجة المنزرعة بمجرد امتصاصها.

النشاط الوظيفى للأكسينات

تتباين الأوكسينات فى نشاطها الوظيفى بالإضافة إلى درجة تحركها داخل الأنسجة وارتباطها مع المركبات الأخرى وكذالك تحللها بالإنزيمات النباتية. وبناءً على ذلك فإن النوع المستعمل منها وتركيزه الفعال يتم تحديده اعتماداً على التركيب الوراثى، ونوع وحجم المُستأصَل النباتى، ومرحلة زراعة الأنسجة. ويلاحظ ارتفاع تركيز الأوكسينات فى كامبيوم النباتات المعمرة فى بداية الربيع حيث تنشط البراعم فى التخليق الحيوى للأكسينات (Funada *et al.*,2001) وربما يكون التركيز الداخلى كافياً لتكوين الكالس دون أى اضافة خارجية لمنظمات النمو. وبالرغم من أن الأوكسينات المصنعة متاحة ومستخدمة كبديل لـ IAA من عدة سنوات إلا أنه مازال من غير المعلوم مدى تشابه الفعل الوظيفى لتلك الأوكسينات مع IAAأو مدى تحويرها لفعله الوظيفى فى الأنسجة. ففى كثير من التطبيقات العملية للأكسينات خصوصاً لإنتاج الجذور يتم خلط أكثر من أكسين واحد. كذلك وجد Przetakiewic *et al.* (2003) أن خلط الأوكسينات أكثر فاعليه فى تكوين الأشطاء لنباتات القمح والتريتيكال والشعير. لكن نظراًلأن تأثير

كل نوع يعتمد على الطراز الوراثى فإنه يفضل استعمال نوع واحد فقط منها. ويكون خلط IAA مع أحد الأوكسينات المصنعة أفضل من استعمال الأوكسينات المصنعة بمفردها. ويمتص الأوكسين عند الرقم الهيدروجينى ٥-٦ فى صورة جزيئات كاملة،وبعد الإمتصاص تهدم داخل الخلايا ببعض الإنزيمات المتخصصة.

تأثير الأوكسينات فى زراعة الأنسجة

يعمل الأوكسين بصورة عامة على الإسراع من نمو الأنسجة بتمدد وانقسام الخلايا ويتم ذلك طبقا لنظريتين هما:

١. ضخ أيون الهيدروجين خلال جدر الخلايا حيث يعمل ارتباط الأوكسين بجدر الخلايا على تكسير اللبيدات المكونة لها. وبذلك تزداد حموضة الجدار وتزداد مطاطية جدر الخلايا ومعدل إمتصاص أيون البوتاسيوم إلى الخلايا لمعادلة أيون الهيدروجين. يترتب على هذا خفض الضغط الاسموزى للخلية وزيادة قدرتها على إمتصاص الماء ومن ثم تتمدد ويؤدى خروج أيون الهيدروجين إلى زيادة حموضة الوسط الخارجى وتنشيط التبادل الأيونى. وبهذه الطريقة يعمل الأوكسين بطريقة غير مباشرة على استحثاث تصنيع إنزيم ATPse الموجود فى الغشاء الخلوى والمسئول عن نقل أيونات الهيدروجين والهيدروكسيل من وإلى الخلية فتزيد نفاذية الجدر للأيونات الأخرى. وهذه النظرية تعد أكثر النظريات قبولاً لتفسير النمو السريع الحادث للخلايا عند إضافة الأوكسين.

٢. أما النظرية الثانية فتفترض أن الأوكسينات تساعد على زيادة معدل تصنيع الأحماض النووية mRNA. وبالتالى زيادة معدل تصنيع أنواع محددة من البروتينيات التى تشجع استطالة الخلايا وانقسامها وقد أمكن تحديد العديد من الجينات التى ينشط تعبيرها الجينى بفعل IAA كبروتين Aux/IAAs. وعلى سبيل المثال عند إضافة الكلورومنيفيكول إلى بيئة نمو مزارع أنسجة نبات الدخان لوحظ انخفاض أو عدم

ذلك فإن عمليات تثبيط فعل الأوكسين سواء فى البيئة أو بعد امتصاصها فى النسيج كالأكسدة والارتباط تؤثر فى النشاط الحيوى للاكسين. وقد أشار (Davies, 2004a) إلى اختلاف النشاط الحيوى للأكسين ليس فقط باختلاف النوع النباتى بل من خلية إلى آخرى وكذلك تبعاً للحالة الفسيولوجية للخلية نفسها. ولعل ذلك يشير إلى أهمية تحديد الحالة الفسيولوجية للنبات الأم المستخدم كمصدر للمستأصل النباتى فمن الطبيعى أن تختلف الحالة الفسيولوجية للنبات باختلاف فصول السنة وعمليات الخدمة المختلفة، وسيتم توضيح ذلك بالباب التالى.

ويمتاز التأثير الحيوى للأوكسينات بشكل الجرس حيث يزيد التأثير برفع التركيز فى مدى يتراوح غالباً بين ٠.١ و ١٠ مكرومول ثم يصبح التأثير سلبى ويرجع ذلك لزيادة تخليق الإثيلين. ويرتبط فعل الأوكسين فى مزارع الأنسجة بنوع وتركيز منظمات النمو الأخرى، لكن قد تمثل كل مزرعة حالة فريدة من حيث استجابتها للاكسين وربما لا تتحقق نفس النتيجة لو حدث تغيير بسيط فى العوامل الأخرى. وبشكل عام تستعمل الأنواع المختلفة من الأوكسينات فى زراعة الأنسجة بتركيزات متباينة لتحقيق أحد الأهداف الآتية:

١. تكوين الكالس والتكشف

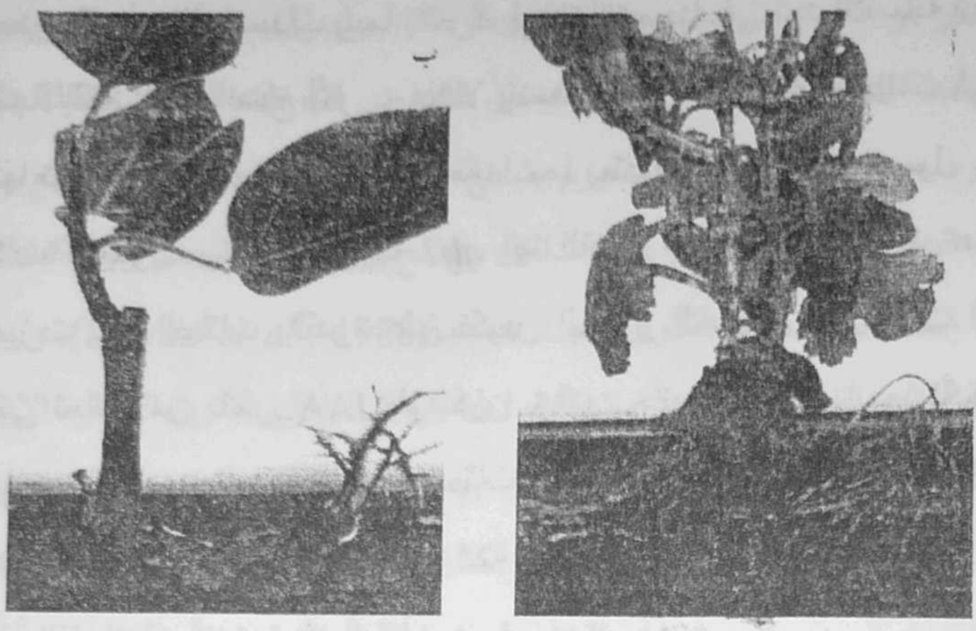
تعمل الأوكسينات على زيادة معدل ارتباط مجموعات الميثيل بالاحماض النووية وبالتالى ترتد الخلية من الحالة المتكشفة إلى الحالة الميرستيمية وتأخذ فى الانقسام وتكوين الكالس. ويشير Terzi &Lo Schiavo (1990) إلى أن زيادة ارتباط مجموعات الميثيل بالاحماض النووية عن مستوى معين تدفع الخلايا للدخول فى حالة التكشف وتكوين أعضاء أو أجنة جسدية مرة أخرى Leljak-Levanic *et al.*(2004). وبالرغم من التأثير الشديد لـ2,4-D على التغييرات الوراثية فإنه قد يستخدم فى بداية زراعة العديد من النباتات بتركيز منخفض فى مدى ١-٣ ملجم/لتر لدفع تكوين الكالس الذى ينقل لاحقاً

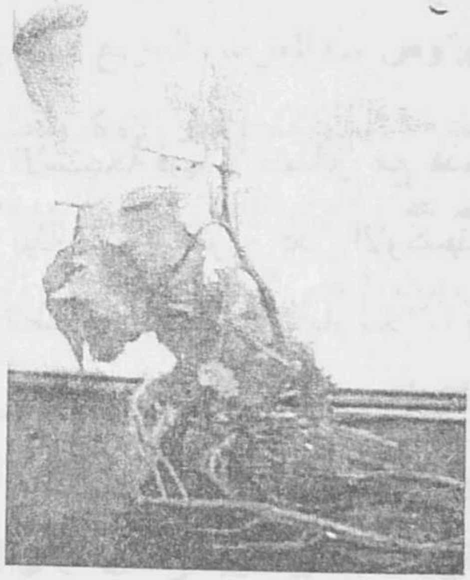
تأثير IAA وكذلك الأحماض النووية المسئولة عن تصنيع إنزيم β-1,3-glucanase الذى يعمل على التحلل المائى لمركب β-1,3-glucanpolysacchrides فى الجدر الخلوية فيؤدى ذلك إلى زيادة مرونتها ومطاطيتها. تؤدى المعاملة بالأوكسين أيضا إلى إنتاج جزيئات سكر Oligosaccharides النشطة حيوياً .

أما تأثير الأوكسينات على عمليات التكشف فى مزارع الأنسجة فترتبط بنوع النسيج ومدى حساسيته للأوكسين. ويبدو أن الأوكسينات قادرة على تنشيط المعلومات الوراثية والفسيولوجية بجينوم الخلية والتى تقود إلى عمليات التكشف. لكن تظل ميكانيكية عمل الأوكسين فى التكشف غير معروفة بالتفصيل حتى الآن. لكن لوحظ أن المعاملة بالأوكسينات تزيد من ارتباط مجموعات الميثيل بالحامض النووى، وقد يكون ذلك مهما لإعادة برمجة الخلية وتحويلها من الحالة غير المتكشفة إلى الحالة المتكشفة حيث استخلصوا فى دراستهم المرجعية الدور الكبير لميثلة الحامض النووى فى عمليات التكشف فى مزارع الأنسجة وتأثير ذلك على عدد وتطور الخلايا الميرستيمية فى الأعضاء المختلفة عبر تحكمها فى التعبير الجينى. ولقد اصبح من المقبول الآن القول أن ميثلة الحامض النووى هى التى تتحكم فى عملية التكشف عبر مجموعة من الجينات الخاصة بالتحكم فى نوعية النسيج. لكن وجد Dunja *et al.* (2004) أن معدل ارتباط مجاميع الميثيل بالحامض النووى أثناء المراحل الاولى لتكوين الأجنة الجسدية لا ترتبط بوجود الأوكسين فى البيئة، وقد انخفض هذا المعدل فى مرحلة نضج الأجنة بصرف النظر عن وجود الأوكسين. لكن تؤدى الزيادة الكبيرة فى تركيز الأوكسين المضاف إلى زيادة الخلل الوراثى فى الخلية والمتعلق بارتباط مجموعات الميثيل بالحامض النووى مما يؤدى إلى استبعادها من التكشف. ولتحديد التركيز والنوع المناسب من الأوكسينات لمزارع الأنسجة لا بد أن يؤخذ فى الاعتبار نوع النمو والتطور المستهدف من المزرعة ومعدل امتصاص وانتقال الأوكسين. ويلعب التركيز الداخلى من الأوكسينات فى النسيج النباتى أهمية كبرى فى تحديد التركيز الأنسب الذى يجب اضافته للبيئة. وبالاضافة إلى

إلى بيئة تحتوى على نوع آخر من الأوكسينات. ويكثر الآن استعمال NAA, IAA وبتركيز عالى نسبياً يصل إلى ١٠ -٢٠ ملجم/لتر لنباتات الفلقة الواحدة وبعض النباتات من ذات الفلقتين. لكن يجب إضافة بعض السيتوكينينات إلى البيئة مع الأوكسينات لإنتاج الكالس، على الرغم من أن وجود السيتوكينينات ليس ضرورياً لتكوين الكالس. وتعمل الأوكسينات على تفكك الخلايا وانخفاض معدل التكشف فى المعلق الخلوى على العكس من السيتوكينينات التى تعمل على بدء تخليق الكلوروفيل فى الكالسات والمعلق الخلوى ثم الدخول فى مرحلة التكشف. لكن ربما يشجع تركيز الأوكسينات العالى فى المعلق الخلوى تكوين الأجنة الجسدية، إذا كانت الخلايا تمتلك القدرة الوراثية لذلك.

تؤكد العديد من النظريات دور الأوكسينات فى تكوين مبادئ الأوراق، حيث يستطيع IAA تغيير الخواص التركيبية للجدار الخلوى وتوجية الالياف الدقيقة المكونة ربما من خلال تخليق بعض البروتينات الخاصة بذلك، وامكن دراسة ذلك من خلال دراسة التكشف فى بعض طفرات الارابدوبسس (Francis & Sorrell, 2001). ويتطلب إحداث التكشف فى مزارع الأنسجة حدوث اتزان بين كلا من الأوكسينات والسيتوكينينات، وعندما تكون هذه النسبة منخفضة فإنه يتوقع حدوث تكشف للأشطاء وعند النسبة المرتفعة يتوقع تكشف الجذور. وغالباً تستخدم بيئة محتوية على الأوكسينات فقط فى المرحلة التالية لاستطالة الأفرع لدفعها للتجذير قبل نقلها إلى خارج المعمل (شكل رقم ٣-٣). ويعتبر IBA أكثر الأوكسينات استخداماً لتكوين الجذور على العقل وأشار Van der Krieken *et al.* (1992) إلى تحول IBA إلى IAA عقب امتصاصه، لكن لا يعنى ذلك عدم تأثيره فى صورته الأصلية. وعلى العكس من السيتوكينينات فإن الأوكسينات فى مزارع القوارير تثبط تصنيع الكلوروفيل فى العديد من النباتات، وتعمل مضادات نقل الأوكسين على زيادة تخليق الكلوروفيل(Singh& Syamal, 2000). لكن التركيز المنخفض جداً والذى يصل إلى ٢٠% عن ذلك المستعمل فى إنتاج الكالس قد يشجع تخليق الكلوروفيل.





شكل ٣-٣: استحداث تكوين الجذور العرضية فى نباتات الأزاليا (أ) والتيك (ب) والعنب (ج)

تتكون الجذور الجانبية من منطقة البريسيكل الملاصق للخشب الأولى وتتحكم الأوكسينات فى عدد الجذور التى تتكشف على المُستأصَل النباتى. كما أن التحرك القطبى للأكسين (Friml, 2003) من الأشطاء إلى الجذور يشير إلى أن انتقال وتراكم الأوكسين إلى البريسيكل هو الذى ينشط انقسام الخلايا ومن ثم تكشف الجذور. لكن يعتبر مسار الأوكسين فى الجذور من العمليات المعقدة والتى تثير الكثير من الجدل حيث يشير

البعض إلى أن الأوكسينات ربما تتحرك فى اتجاة محدد فى أحد الأنسجة بينما تتحرك فى الإتجاة المضاد فى نسيج آخر. وهذا لا يضعف نظرية دور الأوكسينات فى نشؤ الجذور لكنها توضح أن هذه الاشارة أكثر تعقيداً مما يعتقد. وبالفعل تم الحصول على طفرة من نباتات ارابدوبسس يطلق عليها *alf1* لها القدرة على تخليق كميات عالية من IAA وتميزت تلك النباتات بالقدرة على تكوين الجذور الجانبية. أما نباتات الطفرة *alf4-1* والتى تعانى من نقص IAA فلم تكون جذور جانبية إلا بعد المعاملة بهذا الهرمون، ويرجع ذلك لدور الهرمون فى استحثاث انقسام الخلايا فى طبقة البريسيكل (Celenza *et al.*, 1995). لكن تشير هذه الدراسة أيضاً إلى أن تطور تلك المنشأت الأولى خلال طبقة القشرة يقع تحت تحكم آلية آخرى.

٢. تكوين الأجنة الجسدية

لكن هناك عدد من التجارب التى كانت الاستجابة فيها لا تتطابق مع هذه الفرضية حيث تم استحثاث الخلايا لتكوين الأجنة فى بيئة غير محتوية على الأوكسينات، وعُلل ذلك بارتفاع محتوى الأنسجة من الأوكسين الطبيعى. ويستمر انقسام الخلايا ونمو الأجنة بعد ذلك متلازماً مع الانخفاض الطبيعى فى تركيز الأوكسين والراجع إلى تحلله أو ارتباطه مع مركبات أخرى. لكن سجل Bozhkov *et al.* (2002) موت للخلايا وزيادة فى درجة حموضة المزرعة عند استبعاد الأوكسين بغرض دفع نمو الأجنة الجسدية لنباتات *Picea abies*.

وباكتشاف تحكم الرقم الهيدروجينى للبيئة فى تكوين الأجنة الجسدية لنباتات الجزر، أرجع البعض مثل Pasternak *et al.* (2002) تأثير الأوكسينات فى تكوين الأجنة الجسدية ولو جزئياً إلى تأثيرها على الرقم الهيدروجينى للجدر الخلوية. لكن يتلازم تطور الأجنة مع إزالة الأوكسين من البيئة ورفع الرقم الهيدروجينى. كما وجد أن الأجنة الجسدية تتكون فى البيئات ذات الضغط الاسموزى العالى فالبيئات المحتوية على ٠.٧

مليمول من السكر أو ٠.٠٦ مليمول من المانتول أو ٠.٣ مليمول من كلوريد الصوديوم تشجع تكوين الأجنة الجسدية فى الجزر. كذلك فإن التعرض لأيونات المعادن الثقيلة على سبيل المثال ٠.٥-١.٠ مليمول من الكادميوم يشجع تكوين الأجنة وبالطبع لا يرجع ذلك إلى تأثيره على الرقم الهيدروجينى. وهناك تداخل واضح بين تركيز السكر والأوكسينات التى من شأنها استحثاث الخلايا لتكوين أجنة جسدية(Lazzeri *et al.*, 1988). وربما تعمل الأوكسينات المضافة للبيئة على استحثاث فعل IAA الداخلى لتكون الإشارة الاولى لدفع الخلية لتكوين الأجنة الجسدية (2002) .Thomas *et al*. وقد نجح .We *et al* (2009) فى تحديد ثمان جينات تلعب دور فى تكشف الأجنة الجسدية منها Aux/IAA المسئول عن تكوين بعض البروتينات الخاصة باستحثاث تكوين الأجنة الجسدية فى كالوسات القطن. ومن هذا العرض السريع لإمكانية استحثاث تكوين الأجنة الجسدية يمكن القول أن ميكانيكية الاستحثاث وفعل الأوكسينات للأجنة الجسدية غير معروفة بشكل تام ولا تتوقف فقط على الرقم الهيدروجينى. وربما تعمل بعض العوامل البيئية بطريقة مباشرة أو غير مباشرة على التأثير على الفعل الأوكسينى.

٣. مزارع الأعضاء

من المؤكد أن الأوكسينات ضرورية لتشجيع نمو القمم الميرستيمية ومزارع القمم النامية على الرغم من السيادة القمية التى تمتاز بها الأوكسينات. ولذا يجب خفض تركيز الأوكسينات لزيادة معدل تكوين الأفرع دون تكوين الكالس فى المرحلة التالية لنمو هذه الأجزاء. لكن تظل هناك أهميه لتحديد نوعية وتركيز الأوكسين المضاف وارتباط ذلك بالنوع النباتى، وتركيز السيتوكينينات المضافة. وتلعب الأوكسينات دوراً هاماً فى مزارع الجذور واستحثاث تكوين الجذور الجانبية (شكل رقم ٣-٤). وتعتبر التركيزات المنخفضة من الأوكسينات هى الفعالة فى استحثاث نشوء الجذور على النباتات فى مزارع الأنسجة. ويرجع تثبيط تكوين الجذور عند استعمال التركيز العالى منها إلى زيادة تركيز الإثيلين فى الخلايا المعاملة بالأوكسينات خاصة تلك المصنعة له ,.Ali *et al*)

2008 و (Cooke, 2002). وقد يتطلب الأمر معاملة قواعد أفرع نباتات *Juniperus phoenicea* النامية فى مزارع الأنسجة بتركيز منخفض للغاية (٢.٥ ميكرمول) ولمدة خمس دقائق فقط قبل زراعتها فى البيئة لإستحثاث تكوين الجذور على ٤٠% من النباتات بينما نجح ٦% فقط من الأفرع التى زرعت فى بيئة محتوية على نفس التركيز فى تكوين جذور (Loureiro *et al.* 2007) . ومن المعاملات التى تشجع تكوين الجذور على النباتات اعادة زراعتها فى البيئة عدة مرات و خفض شدة الإضاءة لتنشيط ما يعرف بالاستطالة الإظلامية وكذلك اضافة بيئة سائلة فوق البيئة الصلبة (De Klerk, 2002).



شكل ٣-٤: استطالة الأشطاء العرضية وتكوين الجذور لنباتات *Capsicum annuum* فى بيئة MS تحتوى على ٢ ملجم/لتر IBA (يمين) وتقزم الأشطاء وعدم تكوين الجذور فى بيئة تحتوى على سيتوكينينات فقط (يسار).

تنظيم نشاط الأوكسين

لا يتوقف نمو وانقسام وتكشف الخلايا فى مزارع الأنسجة على تركيز الأوكسينات المضافة للبيئة فقط، لكنه يعتمد أيضاً على التركيز الداخلى لـIAA والتداخل بينهما وكذلك على العوامل المؤثرة على ثبات الأخير. ونشاط IAA الداخلى مهم فى

التحكم فى النمو والتكشف فقد وجد أن النباتات التى تعانى من نقص عنصر البورون بها نقص فى IAA حيث لا يصنع RNA المسئول عنه ولا يتم الانتقال الطبيعى لـIAA داخل النبات وينخفض معدل استجابة هذه النباتات للمعاملة بالأوكسين وبالتالى فإن استعمال أنسجة من نباتات تعانى من نقص البورون يتطلب استعمال تركيزات أعلى من الأوكسينات. من الثابت أن IAA حساس للحرارة ويحدث له تكسير جزيئ بالتعقيم الحرارى، بالإضافة إلى تأثره بالضوء. لكن حتى بفرض التعقيم بالترشيح فإن الـIAA لا يعتبر نشط جداً كأوكسين خارجى لتشجيع عمليات النمو والتكشف بسبب تكسيره فى النبات، فبعد ٨ ساعات من إضافته لمعلق خلايا الجزر يكون ٢٠% فقط من الممتص منه فى صوره حرة و ٤٥% فى صورة مرتبطة مع حامض الأسبرتك والنسبة الباقية تتكسر لمركبات أخرى.

وتتفاعل كلاً من الأوكسينات الطبيعية والمصنعة مع بعض المركبات داخل الخلايا كما تلتصق مع بعض الجزيئات الصغيرة وتكون ما يسمى بالأوكسينات المرتبطة conjugation كذلك ترتبط مع بعض البروتينات وتكون معقد وبذلك يثبط فعل الأوكسين مؤقتاً. أيضاً تتكون معقدات أخرى باتحاد IAA مع بعض المركبات مثل الاسترات، والجليكوسيدات والأحماض الأمينية. ويبدو أن هذه ميكانيكية فسيولوجية لحفظ مستوى IAA داخل الخلايا. فبتحلل هذه المركبات أنزيميا يتحرر الأوكسين ليعاود نشاطه مرة أخرى، وبذلك تمثل هذه المعقدات حماية للأكسين من عمليات الأكسدة. وللمزيد عن آلية عمل وأيض الأوكسينات من هذا المنطلق يمكن الرجوع إلى Bertos *et al.* (2008) و Woodward & Bartel (2005). وقد تختلف نسبة الأوكسين المرتبط بين الطرز الوراثية المتباينة، كذلك فإن طبيعة المعقدات المتكونة تتوقف على الأنواع النباتية. كما تتحلل الأوكسينات المضافة خارجياً جزئياً وتثبط داخل الخلايا، فمثلاً يحدث إحلال لذرات الكلور الموجودة فى جزء 2,4-D المضاف إلى معلق خلايا القمح بمجموعات هيدوكسيل ثم يرتبط المركب الناتج مع السكر لينتج مركب غير نشط كأوكسين، لكن لو

ارتبط المركب الناتج مع حامض أمينى فإنه يكون نشط فسيولوجياً. ينخفض مستوى الأوكسين الحر داخل الأنسجة بسرعة عند المعاملة بأكسين خارجى كذلك فإن عمليات غسيل النسيج النباتى قد تقلل مستواه. وبنقص مستوى الأوكسين الخارجى يتم تحلل المعقدات المتكونة من الأوكسين والمركبات الأخرى للحفاظ على مستواه الداخلى. ولكى يقوم الأوكسين بدوره على الأقل فى تنظيم بعض العمليات الحيوية فلابد أن يرتبط بمواقع بروتينية فى الخلية ووجود هذه المواقع المستقبلة للأكسين هام لإحداث الفعل الأوكسينى(Woodward, 2005). وقد يكون أحد أدوار هذه المستقبلات هو تمرير الأوكسين فى الأغشية الخلوية وجعله قادراً على التحرك فى السيتوبلازم.

أيض الأوكسين فى مزارع الأنسجة

تمتص الأنسجة الأوكسينات المضافة للبيئة بسرعة فى صورة جزئيات كاملة عند رقم هيدروجينى أقل من ٦. ويرتبط تركيز الـ IAA الداخلى بمعدل التخليق الحيوى له وأكسدة IAA و IBA و indole-3-propionic acid (IPA) إلى مركبات غير فعالة بواسطة إنزيمات البيروكسيدز. وبذلك تلعب تلك الإنزيمات دوراً محورياً فى ضبط مستوى الأوكسين داخل الخلايا. وتوجد هذه الإنزيمات طبيعيا بصور مختلفة تسمى(isoenzymes) داخل خلايا الأنسجة المنزرعة لكنها تتباين بشدة بين الأنواع النباتية، كما يتأثر تركيزها بعدة عوامل أهمها تركيز الهرمونات المضافة للبيئة. ومما لا شك فيه أن هذه الإنزيمات تؤثر على النمو والتكشف بتأثيرها على تركيز الهرمونات الداخلية. وقد أشارت عدة دراسات إلى دور أنزيم peroxidase فى المراحل المختلفة لتجذير النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة، ويتوقف تركيز peroxidase فى الأنسجة المنزرعة على نوع الأوكسين المضاف. وتوضح نتائج Saxena *et al.* (2000) الخاصة بتجذير نباتات *Plumbago zeylanica* هذا التباين خلال مراحل مختلفة من الزراعة. ولاحظ أن التباين فى تركيز الإنزيم نتيجة المعاملة بتركيزات مختلفة من الأوكسينات كان أشد تأثراً بـ IAA أو IBA عن المعاملة بـNAA أو 2,4-D.

كما سبق القول يؤثر التركيز الداخلى للإثيلين فى أنسجة النبات والذى يرتبط بدوره بالعديد من العوامل الخاصة بزراعة الأنسجة والتى سيتم مناقشتها فى الفصل التالى على معدل التصنيع الحيوى للأوكسين. وتؤدى المعاملات التى تسبب تغييرفى التركيز الداخلى للإثيلين فى كالوس بعض الأنواع النباتية إلى تأثير شديد فى معدل تكوين وتطور الأجنة الجسدية. حيث ثبط تكوين الأجنة الجسدية فى الأوعية محكمة الغلق بسبب زيادة تركيز الإثيلين. وكذلك أدت المعاملة بتركيز ٠.٠١-١.٠٠ ملجم/لتر من الإثيفون إلى استحثاث تكوين الأجنة الجسدية، ويلاحظ أن مستوى الإثيلين فى هذه الحالة كان أقل من تركيزه عند إحكام غلق الأوعية المستعمله للزراعة. وأيضاً تثبط المعاملة بالجلاكتوز التخليق الحيوى للأكسين عن طريق رفع مستوى الإثيلين الداخلى. ومن ناحية أخرى ينظم معدل أكسدة الـIAA ببعض الإنزيمات مثل IAA-oxidase وتوجد كمية كبيرة نسبياً من المثبطات الطبيعية التى تمنع أكسدة IAA بفعل هذا الانزيم فى القمم الميرستيمية للأنسجة التى فى حالة الصبا عنها فى الأنسجة البالغة إلا إذا حدث لها جرح. والمسلك الطبيعى لتثبيط هذه المركبات هو وجود المواد المختزلة. حيث تعمل المواد المختزلة مثل NADH والتى تحفظ الخلية فى حالة جهد اختزالى منخفض على تثبيط أكسدة IAA. وبالتالى تلعب مثبطات الأكسدة دوراً هاماً فى انقسام الخلايا وتكشفها.

دور المركبات الفينولية فى النشاط الأوكسينى

يطلق على المركبات التى تحمل واحداً أو أكثر من مجموعات الهيدروكسيل فى حلقة عطرية مشتقات الفينول وقد تكون فى صوره أحادية أو ثنائية أو ثلاثية الكربوكسيل. وهناك العديد من الأبحاث التى تشير إلى دور تلك المركبات فى تنظيم النمو فى مزارع الأنسجة (Sharifian *et al.*, 2009). وتوجد هذه المركبات بصورة طبيعية فى النباتات حيث تعمل ومشابهتها المصنعة معملياً كعامل مختزل بصورة عامة فى الخلايا. بذلك يمكن أن تعتبر كعامل مختزل للأنزيمات المؤكسدة لـIAA مما يفسر نشاطها كمنظم للنمو

عندما تضاف إلى بيئة مزارع الأنسجة لأنها تحمى الأوكسين من الأكسدة. وقد وجد فى بعض التجارب أن المركبات الفينولية تشجع نمو الكالس وتكشف المزيد من الأشطاء بالإضافة إلى تحسن واضح فى تجذير الأشطاء المتكشفة. لكن يتوقف ذلك على تركيز الفينولات فنباتات *Eucalyptus tereticornis* المتكشفة من مستأصلات نباتية تم جمعها فى الفترة من شهر يوليو إلى سبتمبر كانت ذات مقدرة أعلى على التجذير عن تلك التى جمعت فى باقى شهور السنة وقد لاحظ Das &Mitra (1995) أن ذلك يرجع إلى انخفاض محتوى النباتات من الفينولات فى الفترة من يوليو إلى سبتمبر. وقد أظهرت دراسة Rustaei *et al.* (2009) تشابه تأثير بعض الفينولات مع الأوكسينات وبالذات IAA، فعند إضافة ١٦٢ ملجم/لتر من phloroglucinol إلى بيئة نمو التفاح زاد معدل تكوين الأفرع الجانبية. وكذلك حفز Te-Chato &Lime (2000) تكوين الجذور على نباتات *Garcinia mangostana* باستعمال ٣٤.٥ ميكرومول من المركب السابق. ويبدو أن هذه المواد تحاكى فعل الأوكسين عن طريق المواد الناتجة من أكسدتها مثل phloroglucinol وphloridzin. وقد استخلصت نظرية أن وجود إنزيم polyphenoloxidase المؤكسد للفينول يشجع التجذير بأكسدة الفينولات. كما يعمل كلا المركبين على تثبيط ظاهرة التميؤ الزجاجى لكونهما بادئ لتصنيع اللجنين. كذلك وجد Hoque &Arima (2002) أن phloroglucinol تحفز كالوس *Trapa japonica* على التكشف.

يتضح مما سبق أن معدل تصنيع الفينولات الداخلية فى الأنسجة المنزرعة يؤثر على معدل النمو والتكشف فى زراعة الأنسجة بتأثيره على مستوى ونسبة الأوكسينات إلى السيتوكينينات الداخلية، وبصفة عامة يعتبر وجود الفينولات متلازماً مع درجة التكشف. وتجدر الإشارة إلى أن الأنسجة فى مرحلة الصبا تحتوى على نسبة عالية من المواد الحامية للأكسين من الأكسدة على العكس من الأنسجة البالغة وقد يفسر هذا استجابة الأنسجة فى حالة الصبا لزراعة الأنسجة بالمقارنة مع الأنسجة البالغة. وتقترح

بعض الملاحظات على المستوى الطبيعى للمواد الحافظة للأكسين أن مستوى هذه المواد يكون منخفضاً فى مرحلة بدء تكوين الجذور ثم يرتفع فى مرحلة نمو الجذور. وذلك لأن التركيزات المرتفعة من الأوكسينات لازمة لبدء تكوين الجذور بينما يحتاج نمو الجذور إلى تركيز أقل. وقد لوحظت أهمية انخفاض تركيز IAA فى البيئة أو فى المُستأصَل النباتى فى بعض عمليات التكشف فقد أكد Guan *et al.* (1997) احتياج العقل الدقيقة للتفاح فى مرحلة تكوين الجذور لتركيز مرتفع فى البداية ثم تركيز منخفض لتشجيع نموهما عقب ذلك. فيعتقد أن الأفرع النامية فى المعمل تحتوى على تركيز منخفض من الفينول فى مرحلة بدء تكوين الجذور ومستوى أعلى أثناء نمو الجذر. ويلاحظ انخفاض مستوى الفينول عند نقل النباتات إلى بيئة نمو الجذور مع زيادة نشاط إنزيم البيروكسديز. أدت المعاملة ببعض المشابهات الفينولية مثل phloridzin وcatechol إلى المحافظة على التركيز الداخلى من IAA تحت ظروف الإضاءة العالية. وقد وجد Ascencio-Cabral *et al.* (2008) أن اضافة ٣ جم/لتر من phloridzin إلى بيئة إنبات الأجنة الجسدية لنباتات *Carica papaya* تمنع التميؤ الزجاجى للنباتات وترفع نسبة الإنبات لزيادة معدل تخليق اللجنين.

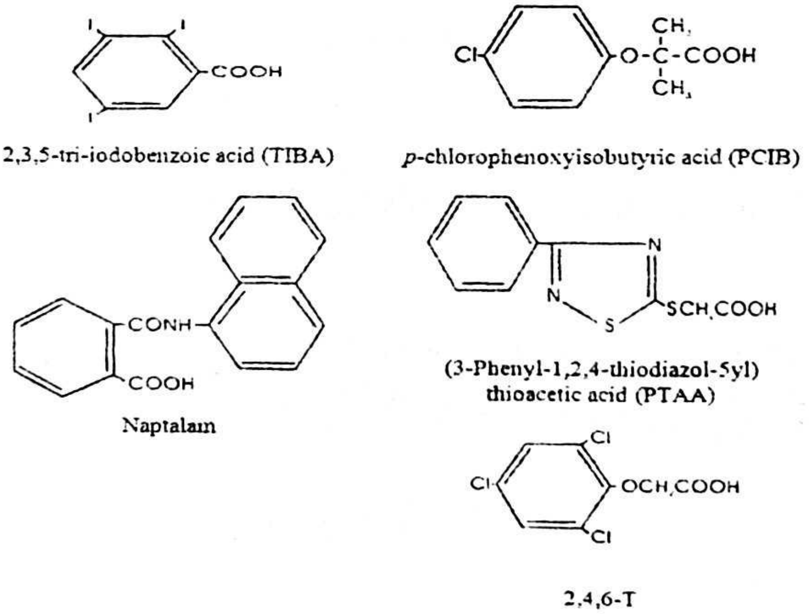
وهناك العديد من المركبات الأخرى التى تصنف ضمن الفينولات مثل coumarins ولها تأثيرات فسيولوجية فى بعض العمليات الحيوية كتصنيع البروتين والكربوهيدرات، والتنفس، والفسفرة الضوئية لكن تظل ميكانيكية عملها غير واضحة على وجه الدقة. وبإضافة تركيزات منخفضة من هذه المركبات يتضح تأثيرها الإيجابى فى مزارع الأنسجة بتأثيرها المعاون لـIAA، أما التركيزات العالية منها فهى منشطة لأنزيمات الأكسدة. وقد لاحظ (Nandi *et al.*, 2002) أن كلا من IBA و coumarin تشجع تكوين الجذور على عقل *Cedrus deodara*. وشجعت إضافة tyrosine إلى بيئة كالوس نخاع الدخان عملية التكشف وفسر ذلك بأن بعض الإنزيمات تحوله إلى coumarins الذى يعمل بدوره على حفظ IAA من الأكسدة (Tartoura *et al.*, 2004)

تأثير الأوكسينات الخارجية ومضادات الأوكسينات على مستوى IAA

ربما تعمل الأوكسينات المصنعة عند إضافتها إلى مزارع الأنسجة على المحافظة على مستوى الـ IAA الداخلى بمنع أكسدته، أو بتثبيط فعل إنزيم IAA-oxidase. وقد فسر تثبيط 2,4-D للتكشف فى بعض المزارع إلى النقص المتزايد فى نشاط IAA-oxidase عند تعرض الأنسجة لـ 2,4-D لمدة طويلة. ويسترد المُستأصل النباتى قدرته على التكشف بنقله إلى وسط خالى أو منخفض التركيز من الأوكسينات لزيادة تركيز الإنزيم فيحدث التكشف وتكوين الأشطاء. من المعروف أن الأوكسينات هى المجموعة الوحيدة من منظمات النمو التى تتحرك داخل النبات بنظام قطبى من القمم النامية إلى أسفل. كما تنتقل الأوكسينات لمسافات بعيدة عبر الأوعية الناقلة (اللحاء غالبا). وتحتفظ الخلايا بمنحنى تركيز للرقم الهيدروجينى عبر الغشاء البلازمى ويكون الجدار الخلوى أكثر حامضية من السيتوبلازم. مما يمكن IAA الذى يوجد فى الوسط الحامضى فى صورة غير مرتبطه من دخول الخلية بالانتشار عبر السيتوبلازم. أما فى الوسط القلوى فيحدث تأين للمعقدات المحتوية على IAA ويتحرر ليمر عبر الغشاء الخلوى. لكن الحركة إلى خارج الخلية لا تتم إلا إذا التصق IAA مع جزيئ حامل، وترجع الحركة القطبية لوجود هذا الحامل فى قاع الخلية.

واستعمل البعض مجموعة من المركبات أطلق عليها مضادات الأوكسين وهذه المركبات تعمل على إيقاف حركة الأوكسين داخل النبات المُعامل أو الأنسجة المنزعة، لكن ميكانيكية عمل تلك المركبات معقدة وغير معروفة بالتحديد. ومن هذه المركبات مركب 2,3,5-tri-iodobenzoic acid (TIBA) والمركب المعروف بـ (3-Phenyl-1,2,4-thiodiazol-5yl) thioacetic acid (PTAA) وكذلك *N*-1-Naphthaylphthalamic acid (naptalam or NPA) (شكل رقم ٣-٥). ويجب التنويه إلى عدم صحة تسمية كل تلك المركبات بمضادات الأوكسين حيث أنها لا تنافس

الأوكسين فى الارتباط بمستقبلاته فى الخلية لكنها تضاد انتقال الأوكسين. فتقوم هذه المركبات بالارتباط بالحامل الناقل لـ IAA مما يمنعه من الارتباط بالأوكسين فيعيق حركته إلى خارج الخلية، وتم فعلاً تحديد بعض هذه المواقع. ففى خلايا الدخان حدد موقعين أحدهما خاص للإرتباط بالأوكسين والآخر من الممكن أن يرتبط بالأوكسين أو naptalam أى هناك علاقة تنافسية بين الأوكسين ومضاد الأوكسين فى الارتباط بالحامل. لكن لو كان الفعل المثبط لمضادات الأوكسينات يتوقف فقط على نقل الأوكسين فى الجدر الخلوية فإنه من المتوقع أن يزيد كلا المركبين فى النسيج المعامل بهما، وهذا غير مطابق للنتائج حيث يزيد TIBA إمتصاص IAA فى المعلق الخلوى خاصة فى الوسط الحامضى. وما زال الفعل الحقيقى لمضادات الأوكسينات غير معروف بدقة(Machakova *et al.*, 2008).



شكل ٣-٥: التركيب الكيميائى لبعض مضادات الأوكسينات

وقد أظهرت مضادات الأوكسينات مثل phenylpropionic acid , ß-NAA و TIBAأثرا فعالاً فى بعض مزارع الأنسجة وبخاصة فى عمليات التكشف عند إضافتها لبيئة الزراعة (Zhang *et al.*, 2004). فتركيز ٥٠ ملجم/لتر من naptalam منع نمو

كالوس الدخان وشجع تكشف الأشطاء فى وجود IAA. ويبدو أنه يشجع تكوين السيتوكينين أو يقلل من نشاط الأوكسين حيث أن الكالس الذى زرع فى بيئة محتوية على ٤.٠ ملجم من الكينيتين و ٥٠ ملجم/لتر naptalam كون أشطاء، لكن عند إزالته من البيئة لم تتكشف الأشطاء. وكذلك فإن *p*-chlorophenoxyisobutyric acid (PCIB) يعيق الفعل التثبيطى لـ2,4-D فى تكشف الأشطاء. وقد تحتوى بعض الأنواع النباتية على تركيز عالى من الأوكسين الداخلى الأمر الذى يكون غير مناسب لتكوين البراعم العرضية، وبإضافة تركيز منخفضفى حدود ٠.٠١-٠.١ ملجم/لتر من TIBA تكشفت أشطاء فى مزارع أنسجة نبات *Pelargonium*، كما وجد Kaparakis &Alderson (2003) أن TIBA ينشط تكوين الكالس لنباتات *Capsicum*. وربما عملت مضادات الأوكسين فى هذه الدراسة على عدم انتقاله إلى أماكن التكشف فزادت نسبة السيتوكينينات إلى الأوكسينات مما شجع التكشف. أيضاً تؤثر مضادات الأوكسينات ومضادات انتقالها على عملية تكوين الجذور فقد ثبط TIBA تكوين الجذور على عقل السويقة الجنينية العليا للطماطم (Tyburski & Tretyn, 2004). واستعمل TIBA بتركيز ١ملجم/لتر بإضافة نقطتين منه فوق قمم الأفرع النامية من الورد كبديل لقرط القمم النامية لتشجع نمو الأفرع الجانبية. أما إضافته بتركيز ٣ ملجم/لتر فشجعت إنتاج الأشطاء فى مزارع هجن الورد(Voyiatzi & Voyiatzi, 1988). واستخدمت مضادات الأوكسين أيضاً فى تكوين الأجنة الجسدية فى مزارع متك الشعير والذرة وكان لـ TIBA تأثيرأفضل من بعض الأوكسينات فى إنتاج كالوس ذو مقدرة على إنتاج أجنة جسدية.

لاحظ Nakano *et al*. (2000) انخفاض معدل تكشف كالوسات نباتات *Lilium formosanuma* بتقدم عمر المزرعة وبالتحديد بعد ٧٢ شهر من التأسيس حيث كان معدل تكشف البراعم العرضية من قطع الكالس هو ١٠% فقط وكان معدل تكوين الأشطاء أقل من فرع واحد لكل قطعة كالوس. ولاستعادة قدرة الكالس على التكشف تم إضافة عدة منظمات النمو إلى البيئة وهى NAA وPIC وTBA و-6

benzylaminopurine (BA or BAP) و N-phenyl-N-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (Thidiazuron or TDZ) وكان المركب الوحيد الذى له قدره على استحثاث التكشف من الكالس هو TIBA. ومن ثم تم إضافته بعدة تركيزات إلى بيئة التكشف فى وجود TDZ, BA وتوضح النتائج المبينة فى جدول رقم (٣-١) إرتفاع نسبة التكشف وعدد الأشطاء الناتجة من الكالس عند إضافة TIBA إلى بيئة النمو. كذلك كان هناك تداخل بين السيتوكينينات المستعملة وTIBA مع عدم التأثير على حيوية الكالس. وأمكن التغلب على عدم تكوين جذور على بعض الأشطاء المتكشفة فى هذه البيئة بزراعتها مرتين فى بيئة خالية من منظمات النمو. ومن هذا يتضح أن الانخفاض فى معدل التكشف بتقدم عمر المزرعة قد يرجع إلى عوامل فسيولوجية خاصة بالأوكسينات حيث أمكن استعادتها بمثبطات نقل الأوكسين وليس لتراكم التغييرات الوراثية كما يفترض كثير من الباحثين. لكن لم يكن لنفس المركب دوراً فى استعادة القدرة على تكوين أجنة جسدية والتى يفترض أنها تعتمد على توزيع محدد للأوكسين داخل الكالس المنزرع وليس تثبيط حركته كليا.

ثانياً: السيتوكينينات Cytokinins

تمثل السيتوكينينات وهى مشتقات من القاعدة النتروجينية البيورينية الأدنين إحدى أهم مجموعات منظمات النمو النباتية والتى تم التعرف عليها فى الخمسينيات من القرن الماضى. وتلعب هذه المجموعة دوراً أساسياً فى انقسام وتكشف الخلايا فى مزارع الأنسجة كما أن لها العديد من التأثيرات الفسيولوجية الأخرى، فهى تلعب دوراً فى تحمل النبات للإجهاد البيئى كالملوحة والجفاف يتم ذلك على المستوى الجينى للخلية حيث تحفز السيتوكينينات الجينات ذات العلاقة بعملية نسخ وإنتاج MRNA الذى يتم فى النهاية ترجمته إلى بروتينات تعمل على زيادة قدرة الخلية على تحمل الإجهاد. ويتم ذلك بطريقة مباشرة أو غير مباشرة بفعل بعض العوامل الأخرى كبعض منظمات النمو التى يشجع تجهيزها بفعل السيتوكينينات.

جدول ٣-١: تأثير TDZ و BA و TIBA على تكشف الأشطاء والأجنة الجسدية من كالوس *Lilium formosanuma* عمر ٧٢ شهر (Nakano *et al.*, 2000).

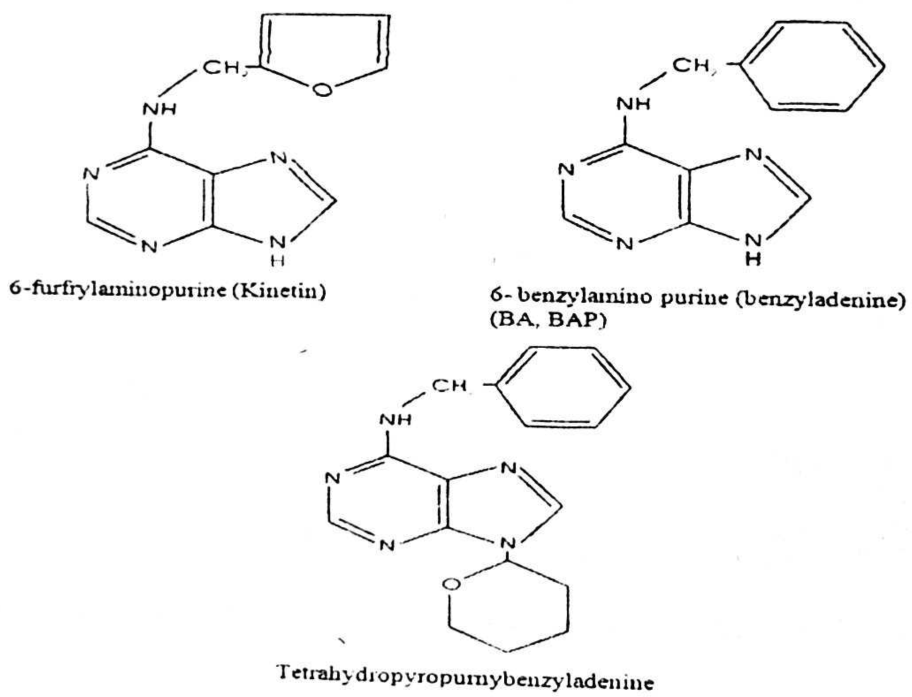
منظمات النمو (ميكرومول)			%لحيوية الكالس	للكالوس المنتج%		المتوسط/كالوس	
TIBA	BA	TDZ		براعم	أجنة جسدية	براعم	أجنة جسدية
٠.٠	٠.٠	٠.٠	١٠٠	٠.٣	٠.١	٠.٨	٠.١
٠.٠	٠.٥	٠.٠	١٠٠	٢.٤	٠.٠	٠.٨	٠.٠
٠.٠	٥.٠	٠.٠	١٠٠	٩.٦	٠.٠	٠.٦	٠.٠
٠.٠	٠.٠	٠.٥	١٠٠	٩.٣	٠.٠	٠.٩	٠.٠
٠.٠	٠.٠	٥.٠	٨٥.٣	٠.٨	٠.٠	٠.٦	٠.٠
٠.٥	٠.٠	٠.٠	١٠٠	٦.٤	٠.٠	٣.٣	٠.٠
٠.٥	٠.٥	٠.٠	١٠٠	٥.٣	٠.٠	٧.٩	٠.٠
٠.٥	٥.٠	٠.٠	١٠٠	٠.٢	٠.٠	٨.٥	٠.٠
٠.٥	٠.٠	٠.٥	١٠٠	٨.٩	٠.٠	٨.٣	٠.٠
٠.٥	٠.٠	٥.٠	٨٥.٧	٣.٥	٠.٠	٩.١	٠.٠
٥.٠	٠.٠	٠.٠	٩٦.٣	٥.٧	٠.٠	٣.١	٠.٠
٥.٠	٠.٥	٠.٠	١٠٠	٧.٤	٠.٠	٩.٤	٠.٠
٥.٠	٥.٠	٠.٠	١٠٠	٨.٣	٠.٠	٨.٥	٠.٠
٥.٠	٠.٠	٠.٥	٨٨.٢	٥.٢	٠.٠	٩.٨	٠.٠
٥.٠	٠.٠	٥.٠	٨٨.٨	٧.٧	٠.٠	٨.٨	٠.٠

القيم مسجلة بعد ٣ شهور من نقل كالوس بأقطار ١-٣ مم إلى بيئة التكشف

كما اتضح أن للسيتوكينينات دوراً فى تنشيط تصنيع البروتين وربما لنفس السبب تعمل السيتوكينينات على تشجيع نضج البلاستيدات الخضراء وتأخير الشيخوخة فى الأوراق المفصولة من النباتات وكذلك على كسر طور السكون لبعض النباتات. وعند إضافة السيتوكينينات إلى أجزاء من النسيج النباتى فإن تلك المناطق تصبح مناطق جذب

للأحماض الأمينية من المناطق المجاورة. وتأثير هذه المركبات على النبات الكامل يكون أقل نسبياً عند مقارنة ذلك بفعلها فى مزارع الأنسجة (Davies, 2004b).

وكان مركب الكينيتين المبين فى شكل رقم (٣-٦) أول مركب اكتشف من السيتوكينينات وقد عزل بواسطة Miller فى سنة ١٩٥٦ بتعقيم الحيوانات المنوية لأحد أنواع الأسماك. وحديثاً تم عزل الكينيتين من بعض المستخلصات النباتية (Barciszewski *et al.*, 2000). وعندما كان Skoog يجرى محاولات لتشجيع نمو كالوس الدخان فى وسط مغذى لاحظ أن معدل نمو الخلايا قد زاد فى وجود IAA إلا أن النمو توقف بعد ذلك. وبإضافة لبن جوز الهند أو مستخلص الخميرة عاودت الخلايا النمو مرة أخرى.



شكل ٣-٦: التركيب الكيميائى لبعض السيتوكينينات.

وحاول Skoog عزل هذا المركب المشجع لانقسام الخلايا والذى عرف أنه من مشتقات البيورين. وعلى الرغم من ذلك يعتقد أن الكينيتين ليس من السيتوكينينات

الطبيعية وأن المركب الذى تم عزله أولا وصنف على أنه من السيتوكينينات هو إعادة تركيب لمركب آخر. وتم الآن تحديد أكثر من ٢٥ مركب طبيعى تتشابه مع الكينيتين فى التركيب وتوجد فى صورة حرة أو مرتبطة غالباً فى صورة جليكوسيدات أو رايبوسيد ومنها Zeatine و Zeatin riboside و 2iP dihydrozeatin ويوجد الزياتين طبيعيا فى صورتين cis و trans والصورة cis هى النشطة بيولوجيا. وحديثا اكتشف Stirk *et al.* (2003) وجود هذه الصورة بنسبة كبيرة فى بعض الأعشاب البحرية والتى يمكن استخدام مستحضراتها للتحكم فى نمو النباتات فى الحقل أو المعمل. وبجانب الصورة الحرة يوجد الزياتين فى صورة جليكوسيدية مرتبطة. وعلى الرغم من وجود السيتوكينينات فى أنسجة النبات الكامل إلا أن العديد من الأنسجة المنزرعة والأعضاء الصغيرة ليست لها القدرة على تصنيعه بكمية كافية للنمو خصوصاً فى النباتات ذات الفلقتين، لذا لابد من إضافة السيتوكينينات إلى بيئة النمو. ويمكن استخدام مقدار النمو الحادث فى خلايا الكالس كمقياس حيوى حساس لتقدير وجود السيتوكينينات. ومع هذا فبعض كالوسات النباتات عريضة الأوراق قد لا تحتاج إلى السيتوكينينات لمقدرتها على تصنيعها. وقد تم عزل كالوس لعدد من النباتات وحيدة الفلقة قادراً على النمو فى غياب السيتوكينينات. وبزراعة هذه الخلايا مع خلايا أخرى ليس لها القدرة على تصنيع السيتوكينينات أظهرت الأخيرة استجابة ونمت (Van Staden *et al.*, 2008). وتُحدث السيتوكينينات تأثيرها بتركيزات منخفضة للغاية ويتضح تأثيرها بدرجة أكبر فى مزارع الأنسجة عند إضافتها مع الأوكسينات حيث يحدث استحثاث لانقسام الخلايا والتكشف كما تحد من ظاهره السيادة القمية وتحرير البراعم من السكون. أى يمكن القول أن السيتوكينينات تضاد تأثير الأوكسينات.

تأثير الأدنين فى مزارع الأنسجة

كانت أول ملاحظة على تأثير الأدنين فى زراعة الأنسجة هى تشجيعه لانبساط أقراص الأوراق المفصولة المعاملة به والطافية فى محلول سكرى. كذلك أدت إضافته

بواسطة Skoog & Tsui فى سنة ١٩٤٨ إلى تكوين البراعم ونمو الأشطاء من العقل الدقيقة لنباتات الدخان. لكن نشاط الأدنين عموماً أقل من نشاط السيتوكينينات، وقد قدر أنه أقل بـ ٢٥-١٠٠ مرة من النشاط الحيوى للكينيتين. وقد أوضح Dickinson *et al.* (1986) أن الأدنين الموسوم بالأشعة يدخل بمعدل بسيط جداً فى تخليق الكينيتين الذى استخلص من الأجزاء الخضرية لنباتات الطماطم. لكن وجد Palni (1984) أن الأدنين الذى أضيف إلى مزارع كالوس *Vinica rosea* يدخل فى تركيب الزياتين بعد ساعة واحدة فقط من إضافته للبيئة. وزاد معدل وجوده بها طردياً بزيادة الزمن ولم يتبقى منه فى البيئة إلا ٠.٢% بعد ١٢٥ ساعة من التحضين. وبصرف النظر عن حقيقة أن نشاط السيتوكينينات راجعاً إلى كونها مشتقات الأدنين فإن الأدنين نفسه مازال يستخدم فى زراعة الأنسجة لإحداث التكشف وتحسين النمو والاستجابة التى تعزى إما لدخوله فى تخليق السيتوكينينات أو تأثيرة المباشر، فقد تبين من بعض التجارب أن تأثيره لا يتضح إلا فى وجود السيتوكينينات. ومن الممكن أن يكون لحامض الادنيلك والادينوسينك نفس تأثير الأدنين لكن بدرجة أقل. وقد يعرف الأدنين على أنه فيتامين B4 ويصنف أحياناً فى تركيب بعض البيئات على أنه ضمن الفيتامينات. وغالباً ما يضاف الأدنين بتركيز ٤٠-٨٠ ملجم/لتر لإنتاج الأجنة الجسدية، كذلك يضاف فى وجود السيتوكينينات لتشجيع التكشف غير المباشر للأشطاء. كما استعمل أيضاً فى زراعة القمم الميرستيمية لتشجيع نموها وأحيانا تكون إضافته لها أساسية للنمو على أساس التركيب الوراثى ونوع السيتوكينينات المضافة.

وبالرغم من كثرة استعمال الأدنين فى زراعة الأنسجة فإن ميكانيكية عمله غير واضحة بشكل تام ولا يعتقد أن تأثيرها يرجع ببساطة إلى كونها مصدر للنتروجين المختزل. وإن كانت نظرية تشجيعه لتصنيع السيتوكينينات داخلياً صحيحة لكن من المفترض أن يكون أكثر تأثيراً من السيتوكينينات المضافة خارجياً. وتعتبر السيتوكينينات الطبيعية والمصنعة مشتقات البيورين والتى يتم تكسيرها فى النبات ويتكون منها الأدنين.

ومن ثم فإن أحد نظريات تأثير الأدنين فى تشجيعه للنمو هى أن الزيادة منه تعمل على إعاقة تكسير السيتوكينينات فى نظام التثبيط العكسى feed-back inhibition أو بالتنافس مع الإنزيمات التى تشارك فى أيض السيتوكينينات. وهناك نظريات أخرى فى هذا الصدد تشير إلى أن الأدنين يعمل كبادئ لتصنيع الزياتين لكن يتم ذلك بمعدل بطئ (Van Staden *et al*., 2008). وعموماً لا تؤدى المعاملة بالادنين دوماً لتأثير إيجابى. فاستعمال سلفات الأدنين بتركيز ٣٠-٣٠٠ ملجم/لتر ثبط تكشف الأشطاء من درنات البطاطس. كذلك فإن إضافة نفس المركب إلى مزارع الأفرع لنبات القرنفل أدى إلى انخفاض معدل تكوينها من القمم النامية المنزرعة وشجع نمو الساق الأساسى، أى أنه يشجع السيادة القمية. ويفضل استعمال سلفات الأدنين عن الأدنين لأنها أكثر ذوباناً فى الماء، وبقى أن يقال أن التركيز الشائع استعماله من الأدنين هو ٢-١٢٠ ملجم/لتر.

التخليق الحيوى للسيتوكينينات

توجد السيتوكينينات فى صورة حرة أو مرتبطة داخل النبات وبدراسة التعبير الجينى للجين IPT فى الارابدوبسس أشار Miyawaki *et al*. (2004) إلى أن السيتوكنينات تخلق فى مناطق مختلفة من أنسجة النبات ويبدو أن الجذور وبالذات القمم النامية لها هى المكان الأساسى لتجهيزها. كما يتم تخليقها فى الأماكن التى لها القدرة على الانقسام كأنسجة الكامبيوم والبذور حديثة التكوين وقد يكون معدل الانقسام البطىء فى المناطق الساكنة من الجذور راجعاً إلى نقص تركيز السيتوكينينات فيها. وتعمل بعض الإنزيمات الخاصة باكسدة أو نزع الهيدروجين من السيتوكينيتات على تثبيط فعلها فى بعض الأنسجة فالجين CKX فى الارابدوبسس منوط به تخليق بعض الإنزيمات التى تعمل على هدم غير عكسى للسيتوكينينات (Sakakibara, 2006) . وبالرغم من أن الجذور المفصولة من كالوس الدخان يمكنها النمو فى وسط خالى من منظمات النمو لا يحدث تكوين ونمو براعم عرضية ولا تتكشف أفرع إلا إذا كانت البيئة محتوية على

السيتوكينينات أو كانت البراعم متصلة أو متطورة مباشرة من كالوس متصل بجذور. لأن كمية السيتوكينينات التى ربما تخلق فى القمم النامية للأشطاء اقل بكثير من تلك المخلقة فى قمم الجذور. وتنتقل السيتوكينينات من الجذور عبر أوعية الخشب إلى باقى النبات، ولذا فإن العصارة المتجمعة من أوعية الخشب عند قطعها تكون عالية فى محتواها السيتوكينينى ويمكن أن تشجع نمو الخلايا المنزرعة. وقد تتكون السيتوكينينات فى أنسجة الأفرع لكن بكميات قليلة بالمقارنة مع تلك المصنعة فى الجذور.

السيتوكينينات المصنعة

رغم استعمال الزياتين و 2iP فى أبحاث زراعة الأنسجة إلا أن إرتفاع سعريهما يعد عائقاً أمام الاستعمال التجارى لهما فى زراعة الأنسجة. ومن ثم تمت عدة محاولات لإيجاد مواد مصنعة رخيصة الثمن تحاكى فى فعلها السيتوكينينات وهى مشتقات الأدينين مثل 6-furfrylaminopurine (Kinetin) و benzylamino purine (benzyladenine, BA, BAP) وتعتبر أكثر تأثير من السيتوكينينات الطبيعية فى تكشف الأشطاء فى مزارع الأنسجة. ويلاحظ أن العديد من المركبات التى لها نشاط سيتوكينينى أو تأثير مضاد للسيتوكينينات لها تأثير مضاد للفطريات وقد تستخدم كمبيد فطرى مثل benomyl ذوالتأثير المشابه للسيتوكينين فى زراعة أنسجة فول الصويا والفجل لكن بدرجة أقل من الكينيتين. لكن يسبب هذا المركب ضرر لبعض المزارع خصوصاً فى الأوانى المغلقة لذا لا يستخدم عملياً كبديل للسيتوكينينات. وقد أدى استعمال مستخلص الخميرة ولبن جوز الهند إلى تشجيع نمو الكالس حيث يحتوى الأخير على الزياتين ومركب 1,3-dihphenylurea ومركبات أخرى مشتقة من اليوريا لها تأثير مشابه للسيتوكينينات.

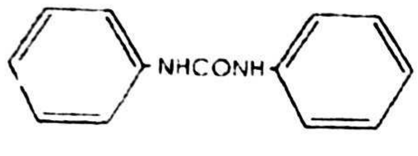
بعد معرفة النشاط السيتوكينينى للمركب *N,N*-diphenylurea (DPU) والمبين فى شكل رقم (٣-٧) استخدمت مشتقاته فى زراعة الأنسجة. وفى بعض التجارب كانت

مركبات الفينيل يوريا أكثر تأثيراً من السيتوكينينات(Huetteman & Preece, 1993) ، فعلى سبيل المثال مركب 4PU-CI له نشاط فسيولوجى يعادل ١٠٠ مرة نشاط مركبBAP فى مزارع كالوس الدخان. وعند استخدامه فى مزارع أنسجة الأزاليا تكشفت أعداد أكبر من الأشطاء بالمقارنة مع الزياتين و 2iP وفى نفس النبات السابق وجد أن مركب Thidiazuron (TDZ) أدى إلى إنتاج عدد أكبر من الأشطاء لكنها كانت أقل من ناحية الجودة حيث كانت متقزمة وممتلئة بالماء بالمقارنة مع استعمال 2iP. ويعتبر مركب Thidiazuron أفضل من السيتوكينينات الطبيعية ومشتقات الفنيل يوريا حيث أن له نشاط يصل إلى ١٠.٠٠٠مرة نشاط DPU. ولذا يستعمل فى المساعدة على تكشف الأشطاء فى الأشجار خصوصاً تلك التابعة لعائلةOliaceae. ووجد أيضاً أن TDZ يشجع إنتاج الأشطاء فى بعض نباتات الفلقة الواحدة ذات الأهمية كقصب السكر. لكن قد يسبب TDZ تقزم فى الأشطاء الناتجة حيث وجد Al-Juboory *et al.* (1998) أن عدد الأشطاء المتكشفة من زراعة أجزاء من نباتات *Gardenia jasminoides* فى بيئة محتوية على ١٥ ميكرومول من TDZ كان أعلى بسبعة أضعاف تقريباً من عدد الأشطاء المتكون فى بيئة محتوية على نفس التركيز من مركب 2iP، لكن كان طول الأشطاء لايتجاوز ١سم أما الأشطاء المتكونة فى بيئة محتوية على 2iP فكان متوسط طولها أطول من ٣ سم. وبصورة عامة زاد طول الأشطاء بانخفاض مستوى السيتوكينينات.

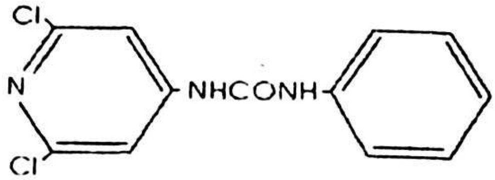
ولتوضيح تباين التأثير الوظيفى لأنواع وتركيز السيتوكينينات المصنعة قام Tsuro *et al.* (1999) بإضافةBA و TDZ ومركب *N*-(2-chloro-4-pyridyl)-*N*-phenyllurea (2Cl-4PU or CPPU) إلى بيئة زرع بها الكالس الناتج من زراعة أوراق *Lavandula vera* فى بيئة تحتوى على 2,4-D والكينيتين. فلاحظ وجود مناطق خضراء اللون فى الكالس المنزرع فى بيئة محتوية على BA تكشفت منها بعد



Thidiazuron (TDZ)



1,3-diphenyurea (DPU)



2,6 Cl-4PU



2 Cl-4PU

شكل ٣-٧: التركيب الكيميائى لبعض مركبات مشتقات الفنيل يوريا.

ذلك أشطاء بصورة فردية. أما الكالس المنزرع فى بيئة بها TDZ و CPPU أصبح لونه اخضر شاحب وما لبث أن تكشفت عليه براعم عرضية بعدد كبير كونت كتل من الأشطاء. لكن تكونت بعض النباتات الخالية من الكلوروفيل عند زراعة الكالس فى بيئة بها TDZ ويوضح جدول رقم (٣-٢) النتائج بعد ٨ أسابيع من الزراعة. وقد امتد أثر السيتوكينينات المستعملة إلى مرحلة التجذير حيث فشلت الأشطاء المتكشفة فى البيئات المحتوية على TDZ و CPPU فى تكوين جذور وماتت فى هذه المرحلة على العكس من الأشطاء التى تكشفت فى البيئة المحتوية على BA. ويعتقد أن هذه المجموعة تعمل على تثبيط إنزيمات أكسدة السيتوكينينات مما يوحى بأن لها نشاط سيتوكينينى.

تأثير السيتوكينينات فى زراعة الأنسجة

إن طريقة تأثير السيتوكينينات مازالت غير مؤكدة حتى على الرغم من دورها المؤكد فى انقسام الخلية. وهناك أدلة على وجود ارتباط بين السيتوكينينات وتصنيع الأحماض النووية والبروتينات الضرورية للإنقسام. وقد ثبت دخول السيتوكينينات فى تصنيع الحامض النووي RNA لإحتوائها على مجموعة الأدنين والتى تعتبر إحدى القواعد النتروجينية الأساسية فى هذا الحامض، وبذلك افترض البعض أن طبيعة عمل السيتوكينينات ترجع إلى دخولها مباشرة فى تصنيع الأحماض النووية بالذات t RNA

كما وجد أنها ترتبط فى مكان محدد مع RNA الخاص بالحمضين الأمينيين السيرين والتايروزين ولها وظيفة متخصصة فى تنظيم العمل الوظيفى بين mRNA و tRNA على أسطح الريبوسومات. لكن لا يعتقد أن دور السيتوكينينات يتوقف على دورها فى تصنيع الأحماض النووية فقط، فقد وجد أن لها دور فى تنشيط تخليق بعض الإنزيمات.

جدول ٣-٢: تأثير ثلاثة أنواع من السيتوكينينات على تكشف الأشطاء من كالوس أوراق *Lavandula vera* . كما بينه Tsuro *et al.* (1999)

السيتوكينينات	التركيز (مليمول)	عدد الكالسات المنزرعة	عدد الكالسات المكونة أشطاء	% للكالوسات المكونة أشطاء
BA	٠.٤٤	٨٩	١	١.١
	٢.٢٠	١١١	١٢	١٠.٨
	٤.٤٠	١٥٠	٨٠	٥.٣
	٢٢.٠٠	٩٠	٨	٨.٩
	٤٤.٠٠	١٢٥	٥	٤.٠
TDZ	٠.٤٥	٦٠	٢	٣.٣
	٢.٣٠	٥٩	٢	٣.٤
	٤.٥٠	١٦٠	٤٥	٢٨.١
	٢٣.٠	١٥٠	٣٤	٢٨.٧
CPPU	٠.١	٧١	١	١.٤
	٠.٢	٨٥	٢	٢.٤
	٠.٤	١٥٠	٧٨	٥٢.٠
	٢.٠	٦٠	٧	١١.٧
	٤.٠	١٠٠	٠	٠.٠

ويجب الإشارة أيضاً إلى أن التأثير الحادث فى تخليق الأحماض النووية لا يتطابق مع نشاطها الوظيفى السريع. يجب الإشارة هنا إلى اهمية تأثير الضوء على فعل السيتوكينينات فى مزارع الأنسجة ففى الضوء العادى أو الأشعة الزرقاء أو الحمراء البعيدة تأثر تكشف الأشطاء بشدة فى نباتات Prunus بفعل BA على معدل تدفق الفوتونات، لكن لم يكن هناك تأثير لمعدل تدفق الفوتونات فى حالة الضوء الأحمر. وفى حالة عدم تعريض المزرعة للضوء فإن هذا الهرمون يثبط استطالة الأشطاء Baraldi *et al.* (1988). وقد أرجع البعض فعل السيتوكينينات كمضادات للإكسينات حيث تعمل على تثبيط إنزيم IAA oxidation. ووجد Kirkham & Holder (1981) أن الكالسات التى تتكشف منها الأشطاء بفعل أضافة السيتوكينيات تكون عادة منضغطة وخلاياها ذات جدر صلبة وجهدها الأسموزى مرتفع بحيث تصبح ذات قدرة على امتصاص الماء من البيئة على العكس من الخلايا الغير منتجة للأشطاء حيث تكون مفككة وجدرها رقيقه وممتلئة بالماء وهذا عكس ما يلاحظ عند استعمال الأوكسينات.

يحدث إمتصاص سريع للسيتوكينينات فى مزارع الأنسجة، وتعمل بعض الإنزيمات الطبيعية مثل الاكسيديز على تحوير فى السلسلة الجانبية للزياتين و 2iP لكنها لا تؤثر على dihydrozeatine. ويفسر Blakesley & Lenton (1987) عدم تأثير أنواع محددة من السيتوكينينات فى مزارع أنسجة بعض الأنواع النباتية إلى التكسير السريع للمركبات السابقة بهذه الإنزيمات، وقد ارتبطت السلسلة الجانبية للزياتين فى كالوس نباتات *Gerbera jamesonii* مع سكر الريبوز لينتج مركب له نشاط سيتوكينينى بعد عشر ساعات من المعاملة بالزياتين، لكن اختفى المركب الجديد بعد ٣٠ ساعة من المعاملة وخلق الريبوسيد ومشتقات أخرى من تحلل السلسلة الجانبية للزياتين. فى العديد من الأنواع النباتية يتم تنشيط إنزيم السيتوكينين اكسيديز عن طريق الإضافة الخارجية للسيتوكينينات فقد لوحظ أحياناً أن السيتوكينينات الخارجية تعمل على خفض تركيز السيتوكينينات الداخلية فى بعض النباتات، والعكس فى بعضها، وربما تكون هذه طريقة

لحفظ مستوى السيتوكينينات فى الأنسجة. وتوجد أنزيمات أخرى فى بعض النباتات تعمل على تكسير البنزيل أدنين، وقد لوحظ فى مزارع الأنسجة لنبات *G. jamesonii* كسر السلسلة الجانبية للكينيتين وأحياناً يحدث هدم لـ BA بهذه الطريقة. لكن يجب توضيح أن تكسير BA إلى مركبات تحتوى على الرايبوسيد لا يعنى عدم نشاطها السيتوكينينى (Van Staden & Drewes, 1992) كما أن المركبات الناتجة قد تكون بمثابة مركبات مخزنة يعاد تخليق BA منها.

ويتوقف تأثير السيتوكينينات فى زراعة الأنسجة على نوع المركب المستعمل، تركيزه، نوع المزرعة، نوع النبات، مرحلة النمو الفسيولوجية للنبات. فقد يكون أحد السيتوكينينات دون الآخر فعالاً فى إنتاج البراعم العرضية تحت نفس الظروف. ولذا قد يستدعى الأمر إضافة أكثر من نوع من السيتوكينينات لإحداث تأثير معين. فقد وجد Purohit & Singhvi (1998) أن إضافة الكينيتين إلى بيئة تكشف الأشطاء من البراعم الجانبية لنبات *Achras sapota* فى وجود BA شجعت من تكشف الأشطاء على الرغم من عدم وجود فروق جوهرية لإضافة الكينيتين. والأهم من ذلك هو أن الأشطاء الناتجة عند إضافته لم تتطور بعد نقلها إلى بيئة خالية من السيتوكينينات على العكس من الأشطاء المتكشفة فى بيئة بها ٢ ملجم/لتر BA حيث استطالت وأمكن تكوين الجذور عليها وأقلمتها، ويمكن توضيح استعمال السيتوكينينات فى مزارع الأنسجة فيما يلى:

١. انقسام الخلايا وتكوين الكالس

يبدو أن السيتوكينينات ضرورية لانقسام الخلايا وفى غيابها يلاحظ تأخر فى حدوث الطور الإستوانى(metaphase) وليس التمهيدى (prophase) ويقترح أن السيتوكينينات لها دور فى تصنيع البروتينات المسئولة عن تكوين خيوط المغزل. وفى حالة نقص السيتوكينينات يتوقف الانقسام الخلوى فى إحدى مراحل الانقسام، وبإعادة نقل الأنسجة إلى وسط يحتوى عليها تعاود الخلية نشاط الانقسام مرة أخرى. ويرجح أن يكون

انقسام الخلية فى الوسط الخالى من السيتوكينينات راجعاً إلى محتواها المرتفع من السيتوكينينات الداخلية بالقدر اللازم للانقسام أو أن الخلايا لها القدرة على تصنيع السيتوكينينات كخلايا نبات Oxalis. وقد سجل تكوين الكالس والجذور عند زراعة العقل الساقية لبعض الطرز الوراثية من الطماطم فى وسط يحتوى على الأوكسين فقط بينما انخفض معدل تكوين الكالس وتكشفت الأشطاء العرضية عند استعمال السيتوكينينات فقط (شكل رقم ٣-٨). وبالفعل تم تقدير كميات مرتفعة من الزياتين و 2iP فى كالوسات الدخان التى انتخبت لقدرتها على النمو بدون الحاجة لإضافة السيتوكسنينات (Laureys *et al*., 1998).

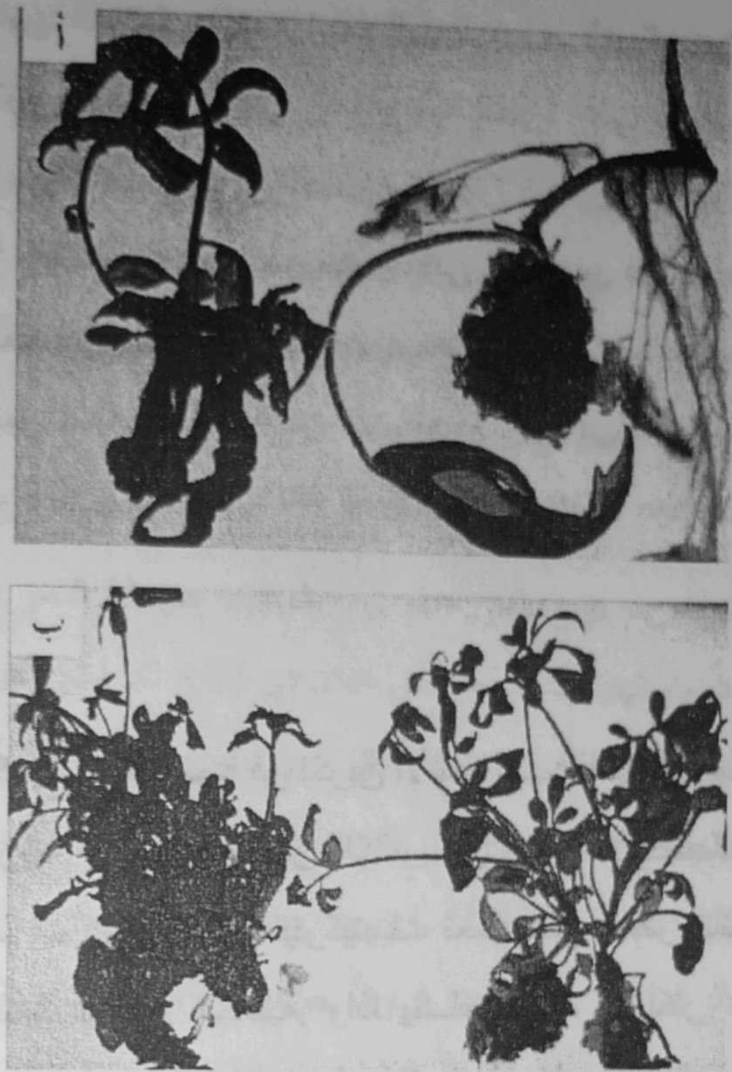
٢. تكشف الأشطاء عرضيا

من المعروف أن السيتوكينينات فعالة جداً فى تكوين الأشطاء سواء مباشرة على النسيج المنزرع أو المتكونة بطريقة غير مباشرة من الكالس فى وجود الأوكسينات. وبالإضافة لتشجيع تكوين البراعم العرضية فإن السيتوكينينات تعمل على خفض تأثير السيادة القمية مما يؤدى إلى نشاط البراعم الجانبية. ولذا يضاف واحد أو أكثر من السيتوكينينات إلى البيئة فى المرحلة الثانية من زراعة الأنسجة. وتؤدى المعاملة الناجحة فى تلك المرحلة إلى تكوين عدد كبير من الأشطاء خلال ٤-٦ أسابيع (شكل رقم ٣-٩). لكن التركيزات المرتفعة تسبب تكشف عدد أكبر من الأشطاء المتقزمه وبها خلل ظاهرى واضح فمثلاً قد يلاحظ تكوين ساق مفلطح به العديد من القمم الميرستيمية (شكل رقم ٣-٩). كما تتضح بها ظاهرة التميؤ الزجاجى، وغالباً تنخفض نسبة التجذير فى النباتات المتكشفة فى بيئة تحتوى على تركيز عالى من السيتوكينينات.

الأولى من تطورها. ولتكوين الأجنة الجسدية بزراعة الأجنة غير الناضجة لبعض سلالات القمح المعروفة بقدرتها المنخفضة على تكوين الأجنة الجسدية لوحظ أن فصل السنابل عن النبات قبل فصل المستأصل النباتى يزيد من معدل تكوين الأجنة الجسدية، وذلك لخفض المحتوى الداخلى من السيتوكينينات والذى يعتبر مصدره الجذور. وقد عزز ذلك عدم تكوين الجذور بإضافة الزياتين للمزرعة (Carman & Campbell,1988)

٤. تثبيط تكوين الجذور

يعمل التركيز العالى نسبياً من السيتوكينينات والذى يصل إلى ٥-١٠ ملجم/لتر على تثبيط أو إعاقة تكوين ونموالجذور. أى أنه يضاد التأثير المعروف للأكسين على الجذور. ومن ثم يجب نقل الأشطاء المتكونة فى بيئة محتوية على السيتوكينينات إلى أخرى خالية منها لدفع الأشطاء إلى تكوين ونمو الجذور قبل نقل النباتات من المعمل. وقد يلزم النقل أكثر من مرة إلى وسط خالى من السيتوكينينات لمحو التأثير المتبقى من السيتوكينينات فى الأنسجة إذا ما كان مرتفعاً. وفى حالات نادرة استعملت تركيزات منخفضة من السيتوكينينات لتكوين الجذور. فقد وجد Soh *et al.* (1998) أن كالوس نباتات *Vigna unguiculata* التى لم تكون جذور فى بيئة تحتوى على الأوكسينات فقط، كونت جذور عند زراعتها فى بيئة تحتوى على السيتوكينينات، لكن تكشفت الجذور مباشرة من الأوراق التى زرعت فى البيئة المحتوية على الأوكسين .وقد تكونت أشطاء وجذور عرضية بكثافة عالية بعد ثلاثة شهور من زراعة العقد الساقية للتين فى بيئة MS تحتوى على ٠.٥ ملجم/لتر من BA فقط (شكل رقم ٣-١٠). كما تطلب تكوين الجذور على العقل الساقية لأحد اصناف الورد المنزرعة معملياً اضافة ١ ملجم/لتر من الهرمون السابق بالاضافة إلى IBA ويمكن تفسير هذا التباين الكبير فى ضوء اختلاف التراكيب الوراثية.



شكل ٣-٨: انقسام الخلايا وتكوين الكالس على قواعد العقد الساقية لنباتات الطماطم ونمو الجذور العرضية، و الزيادة الواضحة فى حجم الأوراق عند الزراعة فى بيئة محتوية على أوكسينات فقط. أما على اليسار فتكون حجم أقل من كالس منضغط أخضر اللون وتكشفت الأشطاء العرضية باستعمال السيتوكينات (أ). على اليمين تكشف الكالس على قواعد العقد الساقية لنبات *Ruta gravoelens* عند وجود الأوكسين فقط فى البيئة وعلى اليسار تكشف الأشطاء العرضية فى وجود السيتوكينين فقط (ب).

٣. تكوين الأجنة الجسدية Somatic embryos

يلزم إضافة السيتوكينينات إلى البيئة لإنتاج الكالس الذى يتميز بالقدرة على إنتاج الأجنة الجسدية بالذات فى النباتات عريضة الأوراق. لكن هناك بعض الملاحظات التى تؤكد أن السيتوكينينات تثبط تكوين الأجنة الجسدية فى بعض النباتات الثنائية، وقد يرجع ذلك إلى إرتفاع المحتوى الداخلى من السيتوكينينات (Razdan, 2002). وقد يكون عدم تكوين الأجنة الجسدية فى بعض الطرز الوراثية راجعاً لذات السبب.

وقد وجد Tokuji & Kuriyama (2003) أن مضادات السيتوكينين تثبط تكوين الأجنة الجسدية فى كالوسات الجزر وبإضافة السيتوكينينات إلى البيئة تكونت الأجنة مرة أخرى، وقد لعب حامض الجبريلك دوراً مساعداً للسيتوكينين فى المراحل



شكل ٣-٩: التكشف العرضى للأشطاء على القمة النامية للنخيل (أ) ومرحلة متقدمة من التكشف (ب)، وعلى أوراق نبات السذب *Ruta gravoelens* عقب شهر من الزراعة فى بيئة MS معدلة مع اضافة ٢ ملجم/لتر من BA (ج)، والمزرعة بعد النمو لمدة ٤٥ يوم فى بيئة سائلة (د)، لاحظ نمو الساق المفلطح فى القرنفل *Dianthus caryphyllus* بسبب التركيز العالى من السيتوكينينات (هـ).

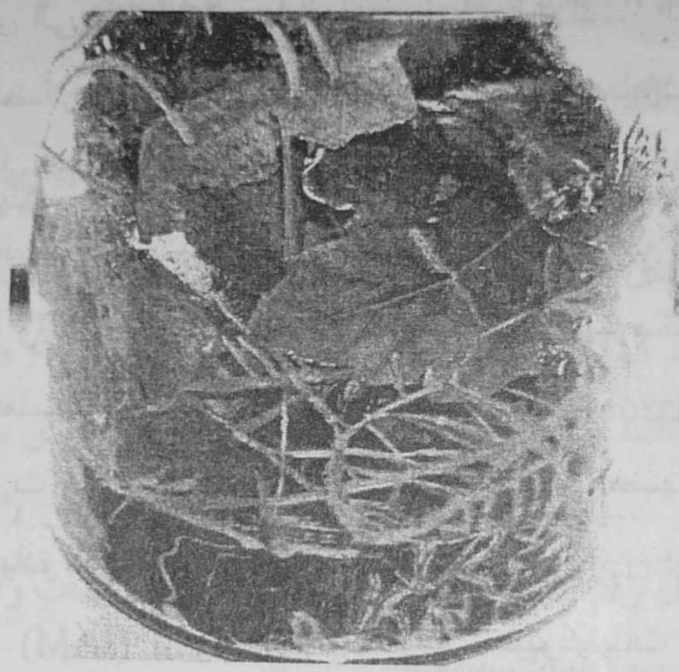
إلى أكثر من ٢ ملجم/لتر، وكانت أفضل درجة حرارة للنمو والتكشف هى ٢١°م (Fonnesbech *et al*., 1979).

مضادات السيتوكينينات

بعض المركبات التى تتشابه فى تركيبها مع RNA مثل Octopamine، Tyraminen، Dopamine من الممكن أن تضاد عمل السيتوكينينات وتثبط انقسام الخلايا وقد تؤدى إلى موتها لتأثيرها السلبى على آلية الانقسام الخلوى. وعلى الرغم من ذلك فإنها لا تضاد عمل السيتوكينينات فى بعض العمليات الفسيولوجية الأخرى كاستحثاث نمو البراعم الجانبية أو تكشف البراعم من الكالس. كذلك فإن بعض المركبات التى تضاد فعل السيتوكينينات فى منع نمو كالوس الدخان تشجع نمو البراعم عند إضافتها مع الأوكسينات، واستنتج من ذلك احتمالية وجود مستقبلات مختلفة للسيتوكينينات. ومن المواد التى استعملت فى بعض مزارع الأنسجة مركبات imidazole وهى من المبيدات الفطرية، وأظهرت تأثيرات فسيولوجية ومورفولوجية بعضها مشابهة للسيتوكينينات حيث أدت إلى زيادة عدد البراعم المتكشفة. لكن استعمل Topoonyanont & Debergh (2001) مركب imazalil (IAM) كمضادات للسيتوكينينات فى التغلب على بعض المشاكل مثل زيادة التفريع فى بعض أصناف *Gerbera jamesonii* أثناء الإكثار الدقيق حيث يلاحظ وجود عدد من القمم النامية المرتبة فى وضع خطى فى قمة ساق متضخم مع توزيع غير طبيعى للأوراق، وهى من الظواهر غير المرغوبة فى الإكثار الدقيق لبعض النباتات.

ورغم أن هذا المركب لا يتبع مجموعة معوقات النمو المعروفة باسم triazoles إلا أنه يشابهها فى التركيب البنائى ويؤثر على بعض الإنزيمات التى تشارك فى تصنيع المركبات التربينيه وبالتالى يعيق تصنيع بعض منظمات النمو مثل حامض الجبريلك (GA_3) والأبسيسك (ABA) بالإضافة إلى الاستيرول والسيتوكينينات. وأدى استعمال

وتتوقف التأثيرات الفسيولوجية السابق ذكرها للسيتوكينينات فى زراعة الأنسجة على درجة حرارة المزرعة. فدرجة الحرارة العالية نسبياً تؤدى إلى خفض فاعلية السيتوكينينات لكنها قد تشجع فعل الأوكسينات. ففى البيجونيا شجعت السيتوكينينات تكوين الأفرع عند درجة حرارة ٢٧ °م أما عند خفض الحرارة إلى ١٥ °م فإن نفس التركيز لا يسبب تكوين الأشطاء. كذلك فى بيئة MS كان النمو وتكوين الأفرع الجانبية من القمم النامية لنبات الأسبرجس الناعم *Asparagus plumosus* أسرع على درجة



شكل ٣-١٠: التكشف العرضى للأشطاء والجذور فى بيئة MS تحتوى على ١ ملجم/لتر من BA.

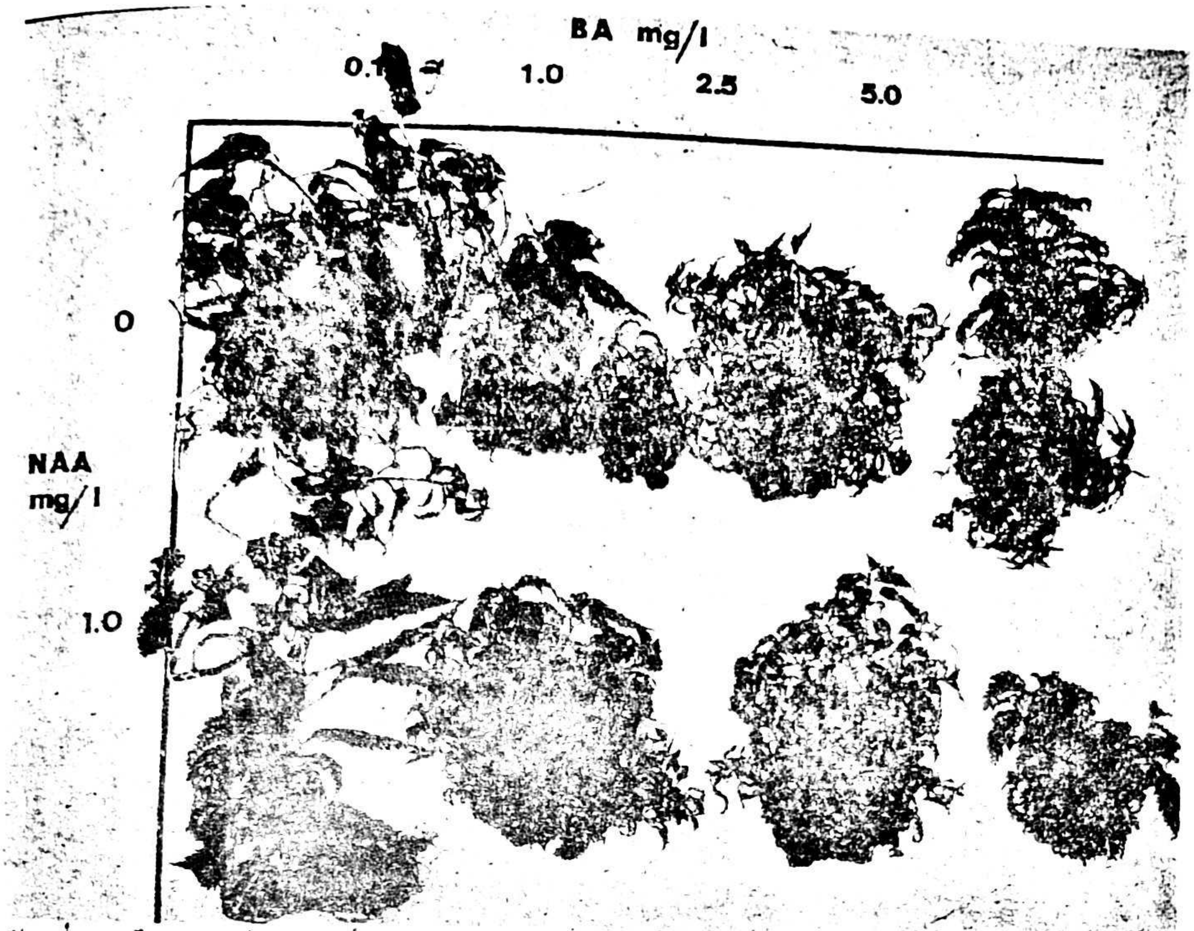
حرارة ٢٤°م لكنها توقفت عن النمو بعد ٤ أسابيع. وكان النمو أبطأ لكنه مستمر عند حفظ المزرعة على درجة ١٧°م. وتوقف النمو عند حفظ المزرعة على درجات حرارة ٩° م أو ٣٠°م. كما زاد التركيز اللازم لدفع تكوين الأشطاء من BAP بزيادة درجة الحرارة، فعند ١٧°م كان أفضل تركيز لتكوين الأشطاء هو ٠.٠٢ ملجم/لتر وبرفع درجة الحرارة إلى ٢١°م كان التركيز الأفضل ٠.٢-٢ ملجم/لتر وعند ٢٤°م تطلب الأمر رفع التركيز

هذا المركب إلى انخفاض معدل تكشف الأشطاء لكن قلت ظاهرة زيادة معدل التفريع اعتماداً على التركيز المستعمل ومصدر النسيج المنزرع. وتشير النتائج إلى أن التركيزات المنخفضة الأقل من ١٢.٥ ميكرومول لم تؤثر على معدل تكشف الأشطاء فى حين أن التركيز المرتفع الأعلى من٢٥ ميكرومول قلل معدل تكشف الأشطاء حيث مات بعضها فى مرحلة مبكرة، وكانت الأشطاء الباقية متقزمة لكنها عاودت النمو عند نقلها إلى بيئة خالية من IAA وأنتجت نبيتات عادية.

التداخل بين الأوكسينات والسيتوكينينات

أصبح من المعروف أن النسبة بين الأوكسينات والسيتوكينينات المضافة إلى بيئة النمو من أهم العوامل المحددة للنمو والتكشف مع الأخذ فى الاعتبار التركيز الداخلى لهما. وكانت بداية تلك الملاحظات عندما وجد Skoog & Millar فى سنة ١٩٥٧ أن كالوس نبات الدخان تتكشف منه الأشطاء عند إضافة تركيز منخفض من الأوكسينات مع زيادة نسبية فى تركيز السيتوكينينات وإذا كان العكس فإن الكالس لا يتكشف فى أغلب الحالات، ويوضح شكل رقم (٣-١١) تأثير التداخل بين الأوكسينات والسيتوكينينات على زراعة أنسجة نبات *Amelanchier laevis*.

وتوالت الأبحاث التى تشير إلى مدى أهمية تركيز الأوكسينات والسيتوكينينات فى عمليات النمو والتكشف فى زراعة الأنسجة. وغالباً تضاد السيتوكينينات فعل الأوكسينات وبالطبع فإن ذلك يتأثر بالنوع النباتى (شكل رقم ٣-١٢) وعدد من العوامل الأخرى المتعلقة بالنسيج بالإضافة إلى الظروف البيئية. ويرجع ذلك إلى أن الاتزان بين المجموعتين ضرورى جداً فى تكوين المنشآت الميرستيمية للجذور والأشطاء. كما يتم تنظيم انقسام الخلية بالاتزان بين المجموعتين والتداخل بينهما فكل منهما يؤثر فى مرحلة معينة من الانقسام فالأوكسين له دور فى تضاعف الـDNA أى استحثاث دورة الخلية بينما تلعب السيتوكينينات دوراً فى التحكم فى عمليات الانقسام الميتوزى للخلية



شكل٣-١١: تأثير تركيز والنسبة بينBA و NAA على استجابة الأجزاء المنزرعة من أوراق نبات *Amelanchier laevis*.

(Pasternak *et al.*, 2000). فعلى سبيل المثال يؤدى التضاعف المتأخر لـDNA إلى زيادة معدل الطفرات والتغييرات الوراثية. ويعتقد أن الخلية لا تدخل فى الانقسام الميتوزى إلا فى وجود السيتوكينينات بينما نمو الكالس والمعلق الخلوى يمكن أن يتم فى وجود الأوكسينات فقط. ومعظم أبحاث زراعة الأنسجة تهتم بحساب التركيز الأمثل والنوع المستخدم من كلا المجموعتين باعتباره حجر الأساس لعمليات التكشف ونمو وتطور الأشطاء. وتوضح نتائج Nakano *et al.* (1999) المبينة فى جدول رقم (٣-٣) أثر استخدام NAA و BA بتركيزات مختلفة على تكشف البراعم العرضية ونمو الأشطاء فى مزرعة أنسجة أوراق نباتات *Begonia tuberhybrida*.



شكل ٣-١٢: استجابة أوراق ثلاث طرز وراثية من الطماطم للزراعة فى بيئة تحتوى على ٠.٥ ملجم/لتر من IAA و ٢ ملجم/لتر منBA.

جدول ٣-٣: تأثير تركيز NAA و BA على تكشف البراعم ونمو الأشطاء من أنسجة أوراق نباتات *Begonia tuberhybrida* كما وجدها Nakano *et al.* (1999) .

NAA	BA	الأجزاء المتكشفة%	عدد الأشطاء/ للجزء المنزرع	عدد الأشطاء الأكبر من ١٠مم/جزء المنزرع
ميكرومول				
٠.٠٠	٠.٠٠	٠	٠.٠	٠.٠
٠.٠٠	٠.٤٤	١٣	٠.٣	٠.٣
٠.٠٠	٠.٤٤	٢٦	٠.٨	٠.٦
٠.٠٠	٠.٤٤	٢٣	١.٣	٠.٣
٠.٥٤	٠.٠٠	٠	٠.٠	٠.٠
٠.٥٤	٠.٤٤	١٠٠	١٢.١	٩.١
٠.٥٤	٠.٤٤	١٠٠	٢٢.٤	٤.٤
٠.٥٤	٠.٤٤	٥٦	١٨.٦	٠.٧
٥.٤٠	٠.٠٠	٠	٠.٠	٠.٠
٥.٤٠	٠.٤٤	٧٨	١١.٩	٦.٧
٥.٤٠	٠.٤٤	١٠٠	٢٠.١	٣.٥
٥.٤٠	٠.٤٤	١٠٠	٢٥.٩	٢.٩

ولدراسة تأثير التداخل بين الأوكسينات والسيتوكينينات على تكوين ونمو الكالس وتكشف الأعضاء من عدة أجزاء نباتية من سلالات تابعة لنباتات *Amaranthus hypochondriacus* وهى *A. hybridus* و *A. caudatus* , و *A. cruentu* قام Bennici *et al.* (1997) باستعمال بيئة MS تحتوى على تركيزات مختلفة من NAA و BA أو 2iP أو الكينيتين كما هو مبين فى الجدولين رقم (٣-٤ و٣-٥) واتضح أن جميع نباتات السلالات المختبرة لها قدرة على تكوين الكالس لكن مع وجود تفاوت بين السلالات المختلفة. إلا أن هذه القدرة المقاسة على أساس الوزن الجاف للكالوس تتوقف على نوع وتركيز ونسب منظمات النمو المضافة. ويلاحظ أيضاً من الجدولين أن تأثير التداخل بين NAA و BA أو 2iP أو الكينيتين وبتركيزات مختلفة امتد إلى مقدرة الكالس المتكون على التكشف ففى بعض البيئات تكونت جذور أو اشطاء فقط وفى بيئات أخرى تكونت اشطاء وجذور على نفس الكالس، بينما لم تظهر الأجزاء المنزرعة فى بعض البيئات أى استجابة. وبصورة عامة يمكن توضيح الاستجابات المتوقعة عند تغيير نسبة كل من الأوكسينات والسيتوكينينات فى بيئة النمو فى الشكل رقم (٣-١٣). لكن يجب ملاحظة أن النتائج فى كثير من الأحيان لا تتطابق مع المتوقع فعلى سبيل المثال:

١. تكوين الأشطاء فى النباتات عريضة الأوراق يحتاج أحيانا إلى وجود الأوكسينات والسيتوكينينات بنفس التركيز.
٢. أنسجة النباتات وحيدة الفلقة تكون الكالس فى وجود تركيز عالى من كلا المنظمين وقد يكون وجود السيتوكينينات ضرورى أو غير ضرورى.
٣. التكشف فى كالوس النباتات وحيدة الفلقة يشجع غالباً بالنقل إلى وسط خالى من الأوكسينات أو على الأقل بخفض تركيزها أو استعمال أكسينات أقل نشاطا مثل IAA. ويرجع ذلك إلى أن طبيعة التداخل بين المجموعتين وتأثير الظروف البيئية معقدة جداً.

ومن ثم ممكن الحصول على أكثر من توليفة من التركيزات لها نفس التأثير الوظيفى فى مزارع الأنسجة، ويمكن الحصول على نفس النتائج فى وجود كلا المنظمين

معا بوضع النسيج فى وسط محتوى على أحد المنظمين ثم نقلهإلى وسط يحتوى على المنظم الآخر.

جدول ٣-٤: تأثير بعض منظمات النمو (ميكرومول) على الوزن الجاف للكالس (ملجم) لنباتات *A. hybridus* و *A. hypochondriac* و *Amaranthus cruentus* بعد شهر من الزراعة (Bennici *et al.*, 1997).

	السلالة والنوع	2,4-D 2.3 + Kin 2.3	NAA 5.4 + BA 4.4	NAA 5.4 + BA 13.3
A. caudatus	PI490458	٢٧	٣٥	١٦
	AMES15114	٢٧	٢٣	١٦
	AMES5461	٥	١.٥	١.٥
المتوسط		٢٣	٢٠	١١
A. cruentus	434	٦١	١٦٥	١٤٦
	622	٢١	٤٤	٥٥
	AMES2248	٣٦	٤٨	٦٨
	AMES2247	٧٣	٢٩	٦٢
	PI511731	٣٧	٦٤	٣٠
	PI477913	٥٠	١٠٩	١٢٦
المتوسط		٤٦	٧٧	٨٦
A.	1122	١٧	١٠	٨٥
	781	٢٣	٨٥	١٩
	467	١١	٦٦	٣٩
	722	٢٢	٧٤	٥٩
	412	٣٤	٢٤	٣٣
	PI540446	٤٢	٤٥	٨٤
المتوسط		٢٥	٥١	٤٨

جدول ٣-٥: تأثير منظمات النمو (ميكرومول) على تكوين الكالس C والأشطاء S والجذور R لسلالات من *Amaranthus cnuentus, A. hybridus* و *A. hypochondriacus* بعد شهر من الزراعة Bennici *et al.* (1997).

النوع /سلالة	NAA 2.7 + 2iP 2.5		NAA 2.7 + Ki2.3		NAA 0.5 + BA0.4		NAA 2.7 + BA 4.4		NAA 5.4 + BA13.3		NAA 0.5 + BA 4.4	
	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
A.cruentus												
434	١٠٠	٤٥	١٠٠	٣٧ ٧٠(R)	-	-	-	-	-	-	-	
1034	-	-	-	-	٧٠	١٠c ٤٧(R)	٩٢	٥٤	١٠٠	٤٥	٨٠	-
A. hybridus												
	١٠٠	١١	١٠٠	-	١٠٠	١٥	١٠٠	-	٦٢	-	١٠٠	٨
A. hypochondriacus -												
674	١٠٠	١٣	١٠٠	١٠ ٨٠(R)	-	-	-	-	-	-	-	-
1221	١٠٠	٥٠	١٠٠	١٠٠(R)	-	-	-	-	-	-	-	-

ثالثاً: الجبريلينات Gibberllins

تعتبر الجبريلينات أحد الهرمونات الطبيعية المخلقة داخل أنسجة النباتات الراقية والدنيئة على حد سواء. وتتركز مناطق تجهيزها فى النباتات الراقية فى الأوراق حديثة التكوين كما تخلق كميات قليلة منها فى الجذور. وقد عزل العديد من أنواع الجبريلينات وتم تسميتها بأرقام تضاف إلى الاختصار GA وذلك حسب ترتيب اكتشافها. وتتفق جميع

تركيز السيتوكينينات منخفض **الاستجابة المتوقعة** **تركيزالأوكسينات مرتفع**

تكوين الجذور على العقل

إنتاج الكالس فى النباتات وحيدة الفلقة

المرحلة الأولى من تكوين الأجنة الجسدية
تكوين الجذور على الكالس
تكو ين الكالس فى النباتات ثنائية الفلقة

تكوين الأشطاء فى النباتات عريضة الأوراق
تضاعف الأشطاء فى النباتات عريضة الأوراق

تركيز السيتوكينينات مرتفع **الاستجابة المتوقعة** **تركيز الأوكسينات منخفض**

شكل ٣-١٣: الاستجابات المختلفة للتركيز النسبى لكل من الأوكسينات والسيتوكينينات فى زراعة الأنسجة

هذه المركبات بأنها مركبات عضوية تحتوى على حلقة Gibban وتخلق من التربينات الثنائية. وتحتوى الأنواع النباتية المختلفة على أنواع مختلفة من الجبريلينات، لكن ليس لكل الجبريلينات نشاط فسيولوجي فى كل الاختبارات الحيوية. ويعتمد نشاطها الوظيفى على قدرتها على الحركة والانتقال داخل النسيج أو تحويلها إلى مركبات أخرى تكون أكثر نشاطا من الناحية البيولوجية. وقد تم التعرف على بعض المركبات الحرة الوسطية اللازمة لتصنيع الجبريلينات والتى لها نشاط بيولوجي مشابه لها. ورغم تعدد أنواع الجبريلينات المكتشفة إلا أن المستحضرات التجارية المستخدمة تكون إما حامض الجبريلك GA_3 فقط (شكل رقم ٣-١٤) أو خليط من النوعين GA_4 وGA_7. وحيث أن تصنيع الجبريلينات فى الأنسجة النباتية عموماً يمكن أن يثبط بعدد من المركبات

المعروفة بمعوقات النمو، فإن إضافة تلك المركبات إلى مزارع الأنسجة يؤثر على النمو والتكشف.

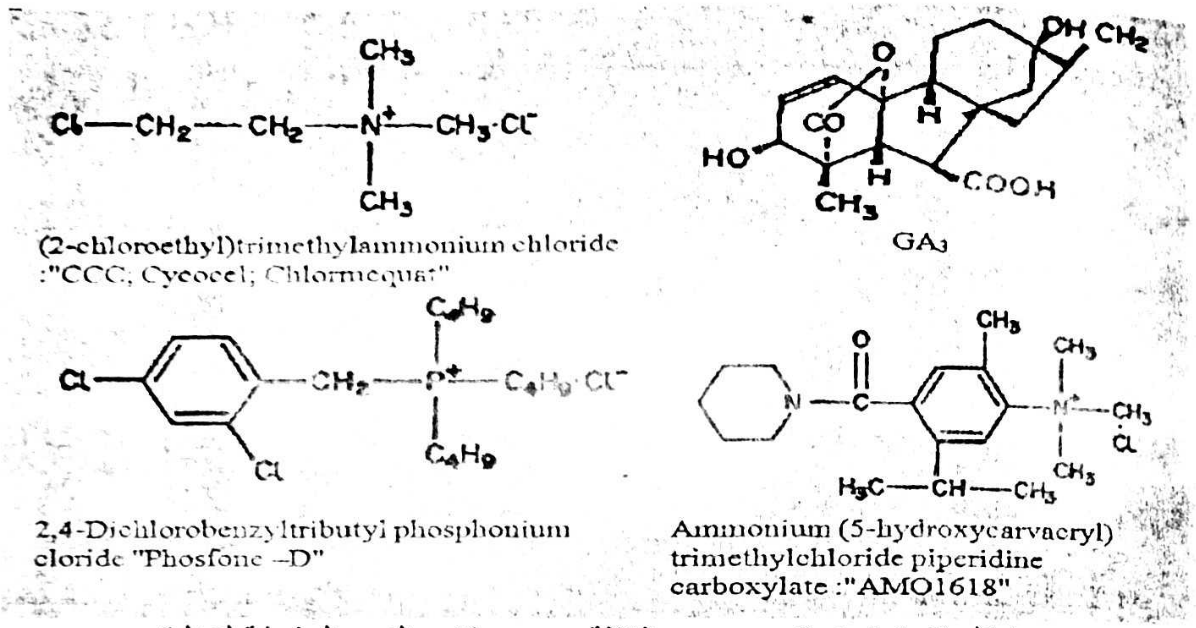
من المعروف ان للجبريلينات تأثيرات واضحة فى النمو والتكشف وينعكس ذلك على الشكل المورفولوجى للنباتات الكاملة. ومن هذه التأثيرات استطالة السوق، تشجيع الأزهار، عقد الثمار ومعظم هذه العمليات تتم عبر التحكم فى التصنيع الحيوى لعدد من الإنزيمات. وقد أوضح Francis & Sorrell (2001) أن حقيقة استطالة الخلايا عقب المعاملة بالجبريلينات لم تكن كاستجابة مباشرة لها لكن لدورها فى رفع مستوى الأوكسين الداخلى بتحويل الأوكسينات المرتبطة إلى أكسينات حرة ومنع أكسدة الأوكسينات بفعل إنزيم بيروكسيديز اندول حامض الخليك وإعاقة إنزيمات الأكسدة عموماً بزيادة تصنيع الفينولات الحرة. ويعتقد أن استطالة الخلايا نتيجة المعاملة بالجبريلينات تقودإلى انقسام الخلايا فى مرحلة لاحقة حيث يحدث تنشيط لانقسام الخلية فى المرحلة G2 من دورة الخلية فى القمم الميرستيمية لبعض النباتات. ومن النظريات التى تفسر استطالة الخلايا عند معاملتها بالجبريلينات زيادة إمتصاص البوتاسيوم وتأثير ذلك على الضغط الاسموزى للخلية. كذلك تلعب الجبريلينات دوراً على المستوى الجينى بزيادة تصنيع RNA وتصنيع بعض الإنزيمات وبالذات تلك المصاحبة للإنبات فى حبوب النجيليات.

دور الجبريلينات فى زراعة الأنسجة

ليس من الشائع استعمال الجبريلينات فى مزارع الأنسجة لكنها تضاف أحياناً لبعض المزارع لإحداث التأثيرات التالية:

١. تكوين الكالس والتكشف

غالباً يحدث النمو والتكشف فى مزارع الأنسجة دون إضافة الجبريلينات، لكن قد يمثل وجودها أهمية فى حالة زراعة الخلايا بكثافة منخفضة. وعند إضافتها للبيئة خاصة بتركيزات عالية نسبياً تتراوح بين ١ : ٨ ملجم / لتر تحدث تأثيرات مشابهه



شكل ٣-١٤: تركيب GA_3 وثلاثة من معوقات النمو المثبطة لتخليقه

للأوكسينات فى نمو الكالس، لكن بعض الأبحاث أشارت إلى تثبيط نمو الكالس بالجبريلينات (George, 1993). وتعمل إضافة الجبريلينات مع الأوكسينات على خفض تأثير السيتوكينينات مما يشجع من نمو الكالس. ولوحظ فى كالوس الدخان أن التأثير المثبط لـGA_3 يكون أكثر وضوحاً فى الظلام عنه فى الضوء ويكون التأثير ممتد، بمعنى أنه يستمر لمدة بعد نقل الكالس إلى وسط خالى من الـ GA_3 ويكون التأثير التثبيطى أوضح فى حالة إضافته فى مرحلة بدء تكوين الخلايا الميرستيمية. وفى بعض الحالات أدت إضافتهاإلى مزارع العقد الساقية فى وجود الأوكسين إلى استطالة السوق وزيادة عدد الأفرع المتكونة. لكن التوليفات المختلفة من GA_3 والسيتوكينينات أقل كفاءة من الأوكسينات والسيتوكينينات فى إنتاج الأشطاء، وربما يتطلب تكوين الخلايا الميرستيمية نقل المزرعة إلى وسط خالى من GA_3 لتكوين الأشطاء. كذلك يمنع GA_3 التكشف المباشر للأشطاء فى بعض النباتات مثل *Begonia*. وبصفة عامة يعتقد أن الجبريلينات تثبط تكوين المناطق الميرستيمية لكنها تشجع تطور نمو الأشطاء عقب تكوينها من هذه المناطق، إلا أن تحديد الاستجابة يرتبط بتوقيت المعاملة ومدتها.

أشار البعض إلى التأثير المشجع للتركيزات المنخفضة (٠.٠٣-٠.٠١ ملجم/لتر) من GA_3 فى تكوين الأجنة الجسدية لكن غالبا تمنع إضافة الجبريلينات إلى مزارع تكشف الأجنة الجسدية (Cheong & Pooler, 2004). ومن ثم تؤدى إضافة مثبطات التخليق الحيوى للجبريلينات إلى زيادة عدد الأجنة المتكونة، وقد سجل ذلك بالفعل فى مزارع أنسجة بعض أنواع الموالح (Spiegel-Roy & Saad, 1986) . لكن كان لمركب Paclobutrazol المعروف بتثبيطه التصنيع الحيوى للجبريلينات تأثيرا قليلا على عدد الأجنة الجسدية فى بعض الأنواع النباتية. ولوحظ ارتفاع مستوى الجبريلينات فى الخلايا غير المتكشفة لسلالات نبات الجزرالتى لا تكون أجنة جسدية، والأجنة الجسدية حديثة التكشف تحتوى على تركيز منخفض من الجبريلينات لحدوث هدم سريع لها. وسجل Emons *et al*. (1993) تأثير مضاد للجبريللين على الفعل المنشط لهرمون ABA فى اكتمال تطور الأجنة الجسدية للذرة.

٢. تكوين الجذور

تثبيط معاملة قواعد العقل بتركيز مرتفع نسبياً من الجبريلينات تكوين الجذور حتى لو تم إضافة الأوكسينات فى نفس الوقت. وكذلك فإن إضافة الجبريلينات إلى مزارع الأنسجة تمنع غالبا تكشف الجذور العرضية على الأشطاء المتكونة. لكن تمكن (Tang & Fan, 1999) من استحثاث تكوين الجذور العرضية على كالوسات *Pinus taeda* باستعمال خليط من GA_3 و BA بالاضافة إلى IBA. وبالرغم من ذلك أشار بعض الباحثين إلى تشجيع تكوين الجذور العرضية باستعمال الجبريلينات، لكن فسر ذلك على أساس زيادة مستوى IAA الداخلى كنتيجة للمعاملة بالـGA_3.

٣. نمو وتطور الأعضاء

بالرغم من أن الجبريلينات تمنع تكوين المنشآت الميرستيمية الأولية فى الكالس والتى تكون الجذور والأشطاء لاحقاً إلا أنها قد تكون ضرورية لتدعيم النمو والتطور

فى الأعضاء المتكونة. ولأن GA_3 يشجع نمو الأشطاء فى مزارع العقد الساقية فإنه يضاف للبيئة فى المرحلة الأولى والثانية من زراعة الأنسجة. وقد ثبتت فاعلية الجبريلينات أحياناً بدرجة أعلى من الأوكسينات فى هاتين المرحلتين. وتضاف الجبريلينات بتركيز منخفض (٠.٠٣-٠.١ ملجم/لتر) إلى مزارع القمم الميرستيمية لتحسين النمو. وكان لإضافة GA_3 بتركيز ٠.١ ملجم/لتر إلى بيئة إكثار بعض أصناف الورد أهمية فى تكشف الأشطاء وزيادة معدلها كذلك لنمو النباتات عقب ذلك. ويجب التنويه إلى أهمية نقل الأشطاء بعد ذلك إلى وسط خالى من الجبريلينات مع إضافة الأوكسينات لدفعها للتجذير(Nikbakht *et al.*, 2005).

ومن الاستخدامات الأخرى للجبريلينات فى زراعة الأنسجة التغلب على بعض المشاكل الناتجة عن استعمال السيتوكينينات ففى الفراولة يلاحظ أن استعمال السيتوكينينات يسبب نمو سيقان مفلطحة لها أكثر من قمة نامية وتعرف هذه الظاهرة بـ*Apical integrity* وهى غير مفضلة من الناحية الإنتاجية. وبإضافة GA_3 إلى بيئة النمو أمكن تصحيح هذا التغيير المورفولوجى. كذلك كانت الجبريلينات بتركيزات ٠.٥ و ٠.٣٥ ملجم/لتر مفيدة فى التغلب على تقزم السيقان لمزارع *Ficus benjamina* و *Acacia sinuata* بسبب زيادة تركيز السيتوكينينات فى البيئة المستعملة للتضاعف (Delamomarco & Picazo, 1994; Vengadesan *et al.*, 2000, 2003). كذلك تضاف الجبريلينات للتغلب على مشكلة السكون التى تتعرض لها النباتات خاصة الأشجار عقب نقلها إلى التربة وقبل نقلها إلى خارج المعمل كبديل للمعاملة بالبرودة فمن المعروف أن البرودة تشجع التصنيع الحيوى للجبريلينات. كذلك فإن المعاملة بالبرودة مهمة لدفع تكوين البرعم الزهرى فى التيوليب ومن الممكن أن تحل المعاملة بـ GA_3 بتركيز ١ ملجم/لتر فى بيئة النمو محل البرودة.

مضادات حامض الجبريلك ومعوقات النمو والتطور

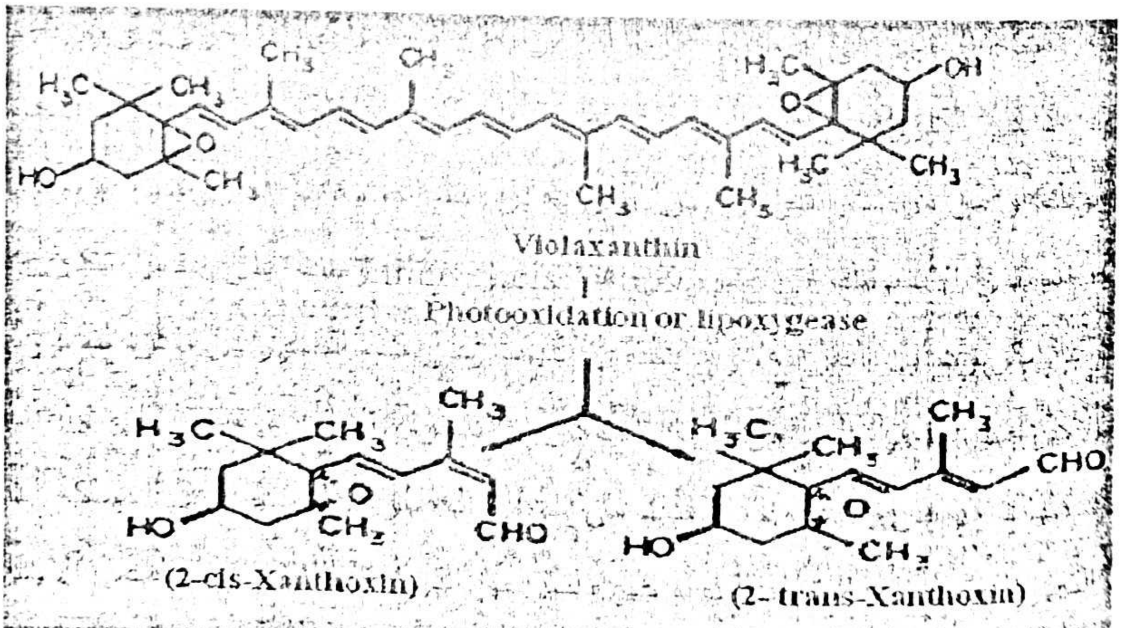
كما سبق القول غالباً تثبط الجبريلينات النمو فى مزارع الأنسجة، وربما تشجع بعض المواد التى تعيق التصنيع الحيوى للجبريلينات نمو النباتات التى تمتاز بارتفاع محتواها الداخلى من الجبريلينات. وبعض هذه المواد ينعكس أثرها بإضافة GA_3 ومن هذه المركبات السيكوسيل; 2- chloroethyl)trimethylammonium chloride CCC; Cycocel; Chlormequat) ومركب Ammonium 5-hydroxycarvacryl) trimethylchloride piperidine carboxylate (AMO1618) وكذلك ومركب 2،4-D Diclhorobenzyltributyl phosphonium cloride "Phosfone –D" ومن هذه المجموعة أيضاً مركب Daminozid لكنه أقل تأثيراً. يشجع CCC و Ancymidol تكوين الأجنة الجسدية فى الموالح والتى تثبط بـ GA_3. وعند إضافة مضاد التخليق الحيوى للجبريللين المعروف بـ Ancymidolإلى بيئة النمو المحتوية على NAA والكينيتين قل معدل تكوين الكالس فى قواعد العقل وحد كذلك من ظاهرة السيادة القمية، وزاد معدل تكوين الجذور والأشطاء ونمو تلك الأعضاء بصورة عامة من العقد الساقية لنبات *Callistephus*. كما تشجع مثبطات الجبريللين تكوين الأبصال فى مزارع الأنسجة. وفى الطماطم لم تشجع إضافة CCC إلى بيئة النمو تكشف البراعم لكن معاملة النبات الأصل بمحلول CCC قبل اخذ الجزء النباتى كان له تأثيراً واضحاً فى تكشف البراعم.

ومن المركبات الأخرى التى ثبت أنها تضاد عمل GA_3 وتشجع تكوين الأجنة الجسدية فى مزارع الأنسجة، المركبات العضوية المحتوية على حلقة Triazol مثل Paclobutrazol وهى فعالة جداً فى منع تكوين GA_3 كما تعيق أيضاً تصنيع Sterol وحامض الابسيسك ABA. وقد شجع مركب Paclobutrazol تكوين الجذور العرضية فى عدد من النباتات. وبمعاملة النباتات المستولدة معملياً بمعوقات تخليق الجبريلين

المشار إليها تمكن Panaia *et al.* (2000) من رفع نسبة نباتات *Symonanthusbancroftii* التى أمكن أقلمتها.

رابعاً: حامض الأبسيسك Abscisic acid

يوجد حامض الأبسيسك ABA والموضح بشكل رقم (٣-١٥) طبيعيا فى معظم أفراد المملكة النباتية فى صورة حرة أو مرتبطة مع مركبات أخرى. ويتم تصنيعه الحيوى داخل الكلوروبلاست الموجود بطبقة الميزوفيل للأوراق النباتية من حامض الميفالونك أو من مركب الفيولازانثين الذى يعتبر أحد الصبغات الكاروتينية فى النباتات. ويوجد حامض الأبسيسك فى صورتين هما cis و trans وذلك على أساس مكان وجود مجموعة الكربوكسيل الطرفية، وقد يحتوى النبات على كلتا الصورتين. لكن الصورة cis هى الأكثر شيوعا فى الطبيعة، ومن الممكن أن تتحول الصورة trans إلى cis داخلياً أثناء عمليات الأيض. كما يوجد العديد من المواد العضوية المنتشرة فى المملكة النباتية ذات التأثير المشابه فى النشاط البيولوجى وليس فى التركيب الكيميائى لحامض الأبسيسك (Davies,2004).



شكل ٣-١٥: التركيب الكيميائى والتخليق الحيوى لحامض الأبسيسك

وغالباً يصنف حامض الأبسيسك كمثبط للنمو لأنه يتحكم جزئيا فى سكون البذور والبراعم، وربما يرجع تأثيره إلى تثبيط فعل الأوكسين فى استطالة الخلايا بزيادة درجة حموضة الخلايا ومطاطية جدرانها. ومن المعروف الآن أن هناك تنافس بين حامض الأبسيسك والجبريلينات على نفس مكان الإرتباط فى الخلية. كذلك يمنع هذا الحامض تصنيع الجبريلينات داخل النبات ويزيد من تحويل الجبريلينات الحرة إلى مرتبطة وغير نشطة بيولوجيا. كما ثبت أن لحامض الأبسيسك تأثيرا إيجابيا على تصنيع ونشاط السيتوكينينات فى النباتات الكاملة. ورغم ذلك فسر تشجيعه لتكوين الكالس أحيانا بدوره فى الحد من النشاط الزائد للسيتوكينينات. ولحامض الأبسيسك عدة تأثيرات فسيولوجية تنظيمية أخرى مثل فتح الثغور، إمتصاص الجذورللماء والأيونات، شيخوخة الأوراق.

يمتص حامض الأبسيسك كجزىء كامل ويؤدى ذلك إلى زيادة حموضة الجدر الخلوية. وغالباً يثبط تكوين الكالس بحامض الأبسيسك لكن فى بعض التجارب وجد أن التركيزات المنخفضة فى مدى ٠.٠٥-٢.٦ ملجم/لتر مشجعة لتكوين الكالس. ويشجع حامض الأبسيسك عمليات التكشف فى بعض النباتات، وكانت أول ملاحظة لذلك هى زيادة معدل تكوين البراعم العرضية على أوراق البيجونيا عند زراعتها فى تربة عادية وانعكس هذا التأثير عند المعاملة بالأوكسين أو حامض الجبريلك. وقد ارتبط هذا التأثير بميعاد المعاملة، بمعنى أن الفصول المختلفة فى السنة تؤثر على المحتوى الداخلى من حامض الأبسيسك مما يؤثر فى النهاية على مدى الاستجابة للإضافة الخارجية. وبناءً على هذا قد يستعمل الحامض لدفع المُستأصَل لتكوين كالوس وتكشف الأعضاء منه (Jimenez & Bangerth, 2001) مع ملاحظة أن هذه التركيزات المنخفضة تسبب نقص فى الوزن الجاف للكالوس وقد تسبب التركيزات المرتفعة إلى وقف التكشف، لكن يعتمد ذلك على النوع النباتى والنسيج المستعمل. وقد يشجع الحامض تكشف الأزهار على النباتات المستولدة فى مزارع الأنسجة وقد لاحظ ذلك Tanimoto *et al.* (1985) عند

إضافة ١٠٠ ملجم/لتر منه إلى بيئة زراعة نباتات *Torenia*. وكان أعلى معدل لتكوين الأزهار عندما تراوح محتوى الأنسجة من الحامض والذى يتوقف على الكمية المضافة خارجياً وتلك الموجودة طبيعياً فى النسيج بين ١٦-٢٠ ملجم/جم. وبعض الأبحاث مثل Hartung & Abou-Mandour (1996) تشير إلى دور إضافة ٢.٥ ملجم/لتر من حامض الأبسيسك فى تشجيع الجذور الجانبية والشعيرات الجذرية لنباتات *Ruta graveolens* مما يرفع نسبة الأقلمة وربما يرجع ذلك إلى تأثيره كمضاد للفينولات.

أوضح Moshkove *et al.* (2008) أن للتركيزات المنخفضة من حامض الأبسيسك دور هام فى التطور الطبيعى وإنضاج الأجنة الجسدية للعديد من الأنواع النباتية. كما قد يعزى تكوين الأجنة غير عادية التكوين وكذلك الأجنة المساعدة التى تتكون على محور الجنين الأصلى واعاقة تطور الأجنة الجسدية لتركيز حامض الأبسيسك. ومن ثم يجب أن يحدد المستوى الداخلى مقدار التركيز الخارجى اللازم إضافته وفى الغالب يضاف حامض الأبسيسك بتركيز ٠.٠٢-١ ملجم/لتر. وقد استعمل بتركيز ٧.٥ ملجم/لتر لتكوين الأجنة الجسدية مباشرة من بذور أحد أصناف الشأى خلال أسبوعين فقط من الزراعة ويرتبط تأثير حامض الأبسيسك فى إنتاج الأجنة الجسدية بوجود IAA الداخلى، وفى غيابه لا يدفع حامض الأبسيسك الخلايا لتكوين الأجنة الجسدية. وقد سجلت زيادة فى مستوى IAA الداخلى بمعاملة الأجنة الجنسية غير الناضجة لبذور نباتات *Helianthus annuus* بحامض الأبسيسك وتكونت منها أجنة جنسية وليس كالوس، أى أن الحامض يعمل على تحوير تركيز الهرمونات الأخرى داخل النسيج (Charriere *et al.*,1999). وقد أمكن باستعمال الهندسة الوراثية والطفرات الحصول على نباتات *Nicotiana plumbaginifolia* مستواها الداخلى من حامض الأبسيسك منخفض. وبزراعة هذه الأنسجة معملياً حدثت إعاقة لتكوين الأجنة الجسدية فى طور ما قبل الكروىpre-globular وبإضافة حامض الأبسيسك إلى البيئة تكونت الأجنة (Feher *et al.*, 2003). ويوضح Dodeman *et al.* (1997) بعد دراسة الطفرات التى

لا تخلق الحامض أو تلك غير الحساسة له من نباتات الارابدوبسس أن حامض الابسيسك يتحكم فى التعبير الجينى للجينات المنوط بها دفع الخلية لتكوين الأجنة الجسدية وكذلك البروتينات التى تخزن فى الخلية أثناء تكوين الأجنة والتى تستخدم بعد ذلك أثناء الإنبات.

خامساً: غاز الإثيلين Ethylene

الإثيلين (C_2H_4) مركب عضوى ينتج طبيعياً فى النباتات الراقية والدنيئة على حد سواء، ويزيد معدل تصنيعه فى الأوراق والثمار فى مرحلة الشيخوخة. ومن العوامل التى تشجع تخليقه داخل الأنسجة الجروح الميكانيكية، الإصابات الحيوية، عمليات الإجهاد البيئى كالملوحة، الجفاف، بعض المعادن السامة، التقليم، سوء التخزين. ويذوب الإثيلين بمعدل ٢٢٥ سم/١٠٠ مل ماء على درجة الصفر المئوى، ويعتبر من أحد الهرمونات النباتية ذات التأثير الفعال فى بعض العمليات الحيوية رغم تركيزه القليل جدا. وتحتوى المناطق الميرستيمية والعقد الساقية الطرفية على كميات كبيرة منه بالمقارنة مع الأجزاء غير الميرستيمية والعقد الساقية القاعدية. ويلاحظ أن هذه المناطق هى التى تحتوى على تركيزات عالية من الأوكسين، أى أن هناك علاقة طردية بين تركيز الأوكسين والإثيلين. لكن وجود الإثيلين بتركيزات منخفضة قد لا تتجاوز ميكرولتر واحد فى جو النمو يسبب نمو غير طبيعى للنبات. ويقوم الغاز بدوره الحيوى بعد ارتباطه ببعض البروتينيات المحتوية على الحديد فى الخلايا النباتية. ويذوب الغاز فى طبقة الفوسفولبيدات من الأغشية الخلوية فيزيد نفاذيتها للمواد العضوية. ويبدو أيضاً أن الإثيلين يلعب دوراً غير مباشر فى تصنيع الحامض النووى RNA والبروتين (Davies, 2004).

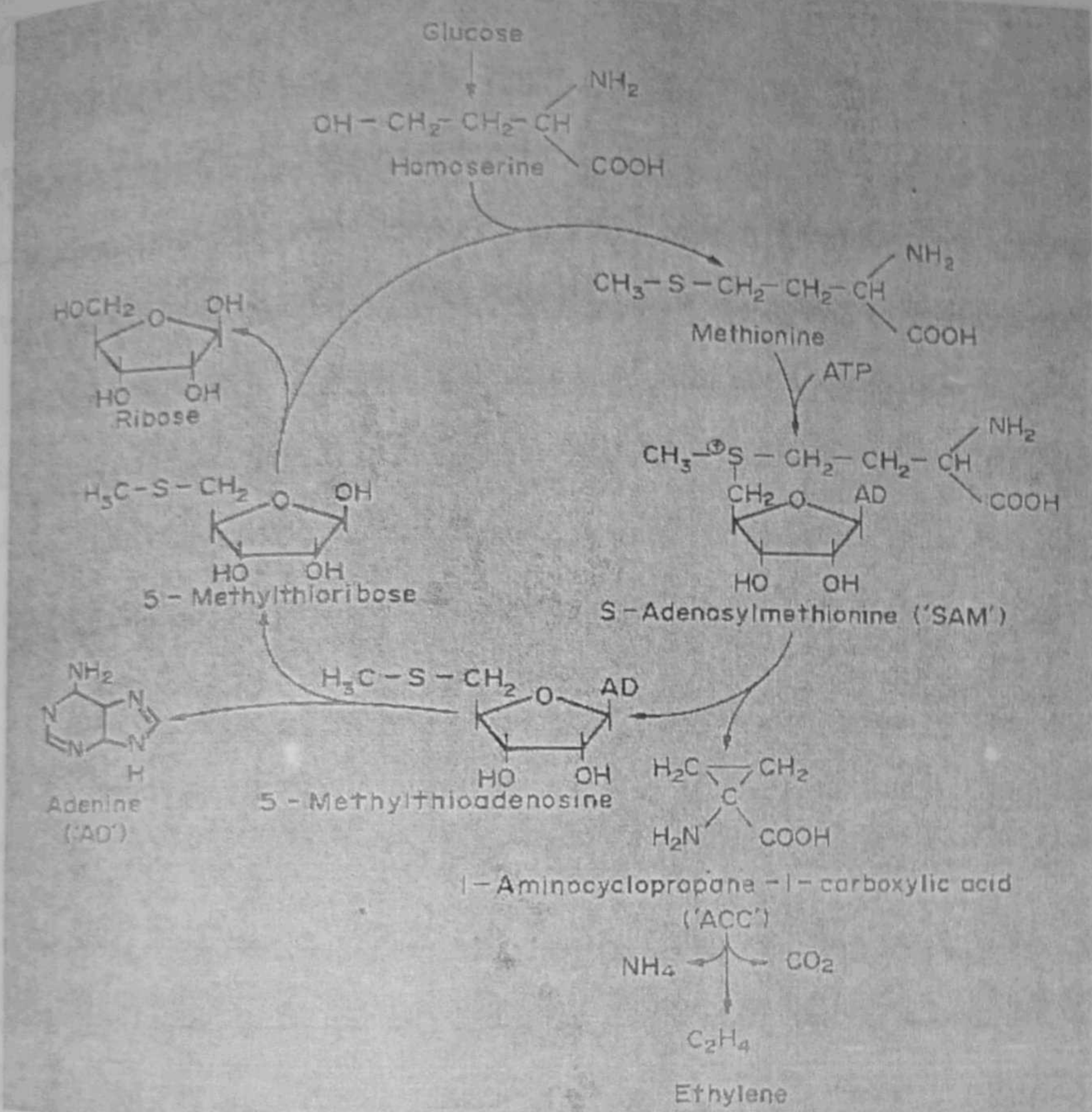
التخليق الحيوى للإثلين ومثبطاته

يعتبر حامض الميثونين المصدر الحيوى لتخليق الإثيلين حيث تزيد إضافته إلى وسط النمو من تصنيع الإثيلين. ويوضح الشكل رقم (٣-١٦) مراحل التخليق الحيوى

للاثيلين، ويتبين أن التصنيع يتم من خلال تخليق مركب aminocyclopropane-1carboxylic (ACC) ومن ثم تؤدى إضافة هذا المركب إلى النبات إلى زيادة تخليق الإثيلين وبالتالى تنشيط العمليات الفسيولوجية الراجعة له. ويتوقف مستوى الإثيلين الداخلى على وجود الإنزيمات المشتركة فى تخليق ACC والأكسجين والشوارد الحرة. ولأن الميثونين يخلق من حامض الاسبارتك فإن إضافة الاسبرجين أو السستين يشجعان تخليقه. كما يحفز وجود الكربوهيدرات، الضوء، الأوكسينات، السيتوكينينات، ثانى أكسيد الكربون تحويل الميثونين إلى الإثيلين. ومن المركبات المستعملة لتوليد الإثيلين داخل الأنسجة النباتية مركب الإيثيفون حيث يمتص ثم يحدث له تكسير داخل الأنسجة ويتحرر الإثيلين فى السيتوبلازم.

ويرجع تأثير المركبات التى تثبط التخليق الحيوى للإثيلين ومنها Aminoethoxyvinylglycine (AVG) ومركب 2,5-norboranadien (NBD) وكذلك أيون الكوبلت والمواد المخلبية إلى تثبيطها فعل الإنزيمات المصنعة له. كما أن المركبات التى تثبط عمليات الأكسدة تعيق تصنيع الإثيلين حيث تمنع تحويل ACC إلى الإثيلين وبعض المركبات تثبط فعل الإثيلين بارتباطها بالغاز نفسه. وتستعمل المركبات التى تثبط فعل الإثيلين كنترات الفضة $AgNO_3$ وثيوسلفات الفضة AgS_2O_3 كبديل للمركبات التى تثبط تصنيعه لإيقاف نشاطه الوظيفى فى حالة وجود تأثيرات غير مرغوبة فى المزرعة. لكن يتطلب الأمر اضافة تركيز عالى يصل إلى ٥-١٠% من ثيوسلفات الفضة أو نترات الفضة لإحداث تأثير مضاد لـ ٥-٢٠ جزء فى المليون من الإثيلين.

كذلك فإن رفع تركيز ثانى أكسيد الكربون فى جو المزرعة إلى ٥-١٠% يثبط الإثيلين لإرتباطه مع مراكز إرتباط الإثيلين بالخلية، لكنه لا يطرد الإثليين المرتبط سابقاً فى تلك المواقع. ويعتبر التركيز الطبيعى من ثانى أكسيد الكربون ضرورى لنشاط الإثيلين، ويعمل غياب الأكسجين على زيادة التأثير المثبط لثانى أكسيد الكربون.



شكل ٣-١٦: التخليق الحيوى لغاز الإثيلين فى الأنسجة النباتية (Davies, 2004).

وقد أمكن تقليل التأثير السلبى للغاز على نمو القمم النامية للقرنفل فى الأوعية المغلقة بامتصاصه من جو المزرعة بوضع كأس به محلول برمنجانات البوتاسيوم فى الوعاء المستعمل للزراعة حيث يمتص حوالى ٧٠% من الإثيلين الموجود فى الوعاء.

إنتاج الإثيلين فى مزارع الأنسجة وتأثيره عليها

ينتج غاز الإثيلين طبيعياً فى كل أنواع مزارع الأنسجة ويزيد معدل التصنيع بتعريض الخلايا للإجهاد فعلى سبيل المثال تشجع بعض المواد كالمانيتول والبولى إثيلين جليكول (PEG) المستعملين لزيادة الضغط الاسموزى أثناء عزل وزراعة

البروتوبلاست من تصنيع الإثيلين. وقد أنتج بروتوبلاست البطاطس المعزول فى وجود PVP كالوس بنسبة أكبر عند إضافة ١٠٠ ميكروجرام من AgS_2O_3إلى البيئة (Perl *et al.*, 1988). ولاحظ Puschmann *et al.* (1985) أن الأوكسينات تشجع تخليق الإثيلين فى مزراع الأنسجة حيث يفترض أنها تعمل على استحثاث نشاط بعض الجينات التى تلعب دوراً فى تخليقه. ويختلف معدل تصنيع الإثيلين فى المزرعة باختلاف الفترة الزمنية عقب تجديد المزرعة، ففى الدخان كانت أعلى زيادة بعد ٥ أيام من النقل ثم قلت النسبة خلال ٦-١٠ أيام التالية. ويفترض حدوث تثبيط لتكوين البراعم العرضية خلال الخمسة أيام الأولى ثم تكشفت بعد ذلك بانخفاض التركيز بعد ١٠ أيام من النقل.

وكما هو الحال فى النباتات الكاملة تزيد نسبة إنتاج الإثيلين فى مرحلة شيخوخة المزرعة، وتكون أعلى ما يمكن فى المعلق الخلوى فى طور الثبات حيث تكون المواد المغذية محدده للنمو. ولأن الإثيلين ينتج طبيعياً فى كل أنواع مزارع الأنسجة فهو يتجمع داخل الأوعية خصوصاً تلك المحكمة الغلق ويتباين التركيز على أساس نوع النسيج، ووزنه، وحجم الوعاء، ونوعية الغطاء ودرجة إحكامه، والإضاءة. ويلاحظ أن الإثيلين يزيد تركيزه داخل الأوعية عند تعريضها للهب أثناء الزراعة بغرض القضاء على التلوث. لكن ارجع Santamaria *et al.*(2000) السبب فى تحسن نمو مزرعة نباتات *Delphinium* عند استخدام أوعية ذات أغطية منفذة إلى انخفاض معدل الرطوبة فى الأوعية وليس لإنخفاض نسبة الغاز. هذا ويؤثر الإثيلين على زراعة الأنسجة فى مراحلها المختلفة كما يلى:

١. عزل النسيج وتكوين الكالس

كما سبق القول تتشابه تأثيرات الإثيلين مع الأوكسين، حيث يزيد الأوكسين من التصنيع الحيوى لـACC الذى يوجد غالباً بتركيزات منخفضة فى الأنسجة النباتية. لكن فى المعلق الخلوى لا تحل الإضافة الخارجية للإثيلين محل الأوكسين الضرورى لانقسام

الخلايا(Moshkov *et al*., 2008). وعند جرح الأنسجة يزيد مؤقتا إنتاج الإثيلين بأنسجة النبات، وبهذا تتكون كمية معنوية منه عند عزل الأنسجة لزراعتها. وإذا تم تنمية الأفرع التى ستكون مصدر للأوراق المستعملة لإنتاج البروتوبلاست فى بيئة مضاف إليها ثيوسلفات الفضة فإن إنتاج الإثيلين يكون أقل.

من المتوقع أن يشجع تراكم الإثيلين فى مزارع الأنسجة نمو الكالس، فالكالس يتكون على السوق والجذور فى النباتات الكاملة عند إحداث جرح بها. وفى عديد من النباتات توجد علاقة بين معدل تصنيع الإثيلين وتكوين الكالس فالمركبات التى تثبط فعل الإثيلين تثبط تكوين الكالس بنفس معدل إضافتها. لكن فى بعض الحالات سجلت بعض النتائج التى تدل على تثبيط الإثيلين لتكوين الكالس. ففى البطاطس يحدث تغليظ فى جدر الخلايا المفصولة وتثبط انقسام الخلايا غير المتكشفة. وقد وجد أن تركيز ١٠ حجم/مليون حجم يمنع تكوين الكالس وقصيبات الخشب فى أجزاء النخاع أى أن الغاز منع إعادة تكشف الخلايا، وبمجرد تأهيل الخلايا المتكشفة واعادة برمجتها للإنقسام فإن الغاز لا يؤثر عليها. وفى أصناف الأرز المعروفة بزيادة معدل انتاجها من الإثيلين تزيد نسبة الموت الموضعى لأجزاء الكالس بالمقارنة بالأصناف التى تخلق الغاز بنسبة أقل. ويثبط رفع الإثيلين فى جو المزرعة تكوين الكالس فى الأصناف التى تخلق الإثلين بمعدل عالى Adkins *et al*. (1990). لكن لاحظ Al-Knayri & Al-Bahrany (2001) أن نترات الفضة تزيد من وزن كالوس النخيل فى غياب السيتوكينين من البيئة.

٢. تكشف ونمو الأشطاء

حتى الآن لم يتضح دور الإثيلين فى عمليات التكشف العرضى للبراعم بصورة دقيقة بالرغم من معرفة تأثيره المثبط على الحركة القطبية للأكسين والذى يؤثر بالطبع على التكشف وتكوين الأعضاء. ومن نتائج العديد من الدراسات اتضح أن هناك حد حرج من تركيز الغاز عنده يستحث التكشف وزيادة هذا التركيز تؤدى إلى نتائج عكسية. ففى

نبات *Helianthus annus* لاحظ Robinson & Adams (1987) تثبيط الإثيلين لتكوين الأشطاء وكان التأثير ممتداً من معاملة البادرات التى استعملت كمصدر للمستأصل النباتى والتى نميت فى الظلام، حيث يقلل الضوء من حساسية الأنسجة للغاز، وامكن التأكد من ذلك بمعاملة البادرات بتركيز ١٠ مليمول من AVG. كما ثبطت معاملة سوق البيجونيا بتركيز ٢-٢٠ ملجم/لتر من الإثيفون تكوين الأشطاء وشجعت تكوين الكالس. ويشجع كلاً من الإثيلين وثانى أكسيد الكربون اللذان يخلقان فى الأنسجة النباتية أثناء الـ ١٥ يوم الأولى من زراعة الأوراق الفلقية للصنوبر تكوين البراعم العرضية إذا كانت الأوعية محكمة الغلق، وأرجع ذلك إلى تشجيع تكوين الإثيلين، ويقل معدل تكوين البراعم بانخفاض معدل تكوين الإثيلين. وفى الأوراق العصارية لنبات الليليم زاد عدد الأشطاء المتكونة عندما رفع تركيز الإثيلين فى الجو المحيط بمعدل ١-١٥ حجم/مليون خلال ٣-٥ أيام الأولى من الزراعة (Moshkov *et al.*, 2008). كذلك شجعت إضافةACC بتركيز ٠.١-١٠ ملجم/لتر إلى مزرعة التيوليب تكوين الأشطاء. لكن ثبط AVG تكوين الأشطاء فى مزارع *Populus*.

غالباً يثبط الإثيلين الموجود فى الجو المحيط بالبادرات والأفرع نمو الخلايا فى المناطق الميرستيمية، وربما يثبط أيضاً تكوين الجذور فى النباتات وحيدة الفلقة. ويكون هذا التأثير أقل فى النباتات ثنائية الفلقة بالرغم من أن بعض النباتات مثل البسلة تكون شديدة الحساسية له. لكن فى الواقع نادراً ما يلاحظ هذا التأثير المثبط. وتؤكد بعض الملاحظات التى سجلت فى مزارع *Klaanchye* و البجونيا أن الإثيلين المتجمع فى أنابيب الزراعة يثبط نمو الأشطاء بتقليل عدد السلاميات. وأدى تراكم الغاز عند تنمية أشطاء القرنفل فى أوعية مغلقة إلى نقص فى طول السلاميات، وكانت الأوراق شاحبة وأكثر إختزناً للماء(Fal *et al.*, 1999).

وأدت إضافة الإيثيفون إلى استعادة الأشطاء لشكلها المورفولوجي الطبيعي. كذلك أدت إضافة مولدات الغاز كالميثونين بتركيز ٥٠-١٠٠ ملجم/لتر مع وجود BAP إلى زيادة معدل تكوين الأشطاء في العديد من الأشجار الخشبية. لكن كان نمو أفرع الفرد المتكشفة غير جيد تحت تأثير الميثونين في الأوعية المغلقة. وبتعريض مزارع عدة أجناس من نباتات Ptilotus إلى تركيزات مختلفة وفترات مختلفة للإثيلين وذلك بغلق الأوعية في غرف زجاجية تحتوى على تركيز محدد من الغاز، زاد عدد الأشطاء وارتفاع نباتات *P. nobilis* عند تعرضها لتركيز ١٠٠ ملجم/لتر/ساعة/ أسبوع ولمدة ثلاثة أسابيع. ولم يلاحظ هذا التأثير على مزارع *P. spicatus* حتى عند رفع التركيز إلى ٣٠٠ ملجم/لتر، لكن بهذه المعاملة زاد معدل التجذير إلى اربعة امثال معاملة المقارنة كما استمرت الزيادة في وزن الجذور حتى بعد نقل النباتات على بيئة جديدة (Prameswara *et al*., 2009). وقد أشارت الدراسة السابقة إلى دور المعاملة بالإثيلين في تلوث مزرعة *P. nobilis* حيث تبين وجود مستعمرات بكتيرية صفراء لامعة على سطح البيئة، وربما كانت ناتجة من تلوث داخلي للنسيج نشط بسبب ضعف نمو النبات بتعريضه للإجهاد بسبب المعاملة بالإثيلين.

٣. تكشف ونمو الجذور

يؤدى حفظ النباتات فترة طويلة في جو مشبع بغاز الإثيلين إلى زيادة تكوين الجذور على العقل. وقد شجع تركيز ٥٠ ميكروجرام من IAA تكوين الجذور العرضية من الأقراص الورقية المجهزة من نبات الطماطم في حين ثبطت المعاملة بالإثيلين أو الايثيفون التجذير، وذلك على الرغم من تشجيع الإثيلين تخليق الأوكسين في الأنسجة. وزاد عدد الجذور المتكونة بخفض تركيز الإثيلين بالتهوية أو بامتصاصه في محلول بكلوريت الزئبقيك أو المعاملة بنترات الفضة بتركيز ١٧ ملجم/لتر لمدة نصف ساعة. وعند زراعة طبقة رقيقة من خلايا الدخان في وسط مناسب لإنتاج الجذور باستعمال

تركيز عالى من الأوكسينات ومنخفض من السيتوكينينات زاد إنتاج الإثيلين فيها بمعدل ١٠٠ مرة عن زراعتها فى وسط غير ملائم لتكوين الجذور. وكان التجذير متلازم مع إرتفاع نسبة الإثيلين والتى كانت فى أعلى معدل لها عند ٥٣٠ م، وإضافة أيونات الفضة إلى الوسط أعاقت تكوين الجذور وشجعت تكوين البراعم العرضية. ومازال هناك جدل حول ما إذا كان الإثيلين هرمون تجذير أم لا.

٤. تكوين الأجنة الجسدية

وجد لحجم وعاء الزراعة تأثير على تكشف الأجنة الجسدية فى العديد من النباتات. يشير ذلك إلى أن المواد الطيارة المتكونة فى المزرعة وعند تركيز محدد تؤثر على تكوين الأجنة. ولاحظ Chen & Chang (2003) أن التركيز المنخفض من ACC فى حدود ٥-١٠ ميكرومول اعاق التكشف المباشر للأجنة الجسدية من أوراق نبات *Oncidium* لكن عند رفع التركيز إلى ٢٠-٥٠ ميكرومولر تكشفت الأجنة. وفى البرتقال الشموتى شجع الإيثيفون بتركيز ٠.٠١-١.٠ ملجم/لتر تكوين الأجنة لكن التركيز الأعلى والذى تولد من إحكام غلق الأوعية ثبط تكوينها. وفى تجارب أخرى وجد أن الإثيلين يثبط تكوين الأجنة الجسدية وأن إضافة ١-٣ ملجم/لتر من نترات الفضة إلى مزارع المتوك لبعض أصناف Brassica يزيد عدد الأجنة المتكونة بل ويساعد على تكشف الأجنة فى بعض الأصناف التى كان من الصعب إنتاج الأجنة الجسدية فيها. كذلك شجع اسيتيل حامض الخليك تكشف الأجنة لكن بدرجة أقل من نترات الفضة. ووجد أيضاً أن الكالس غير المكون للأجنة الجسدية من *Picea abies* ينتج إثيلين ١٠مرات قدر الكالس المكون للأجنة.

٥. تكوين الأبصال

يلعب التخليق الحيوى للإثيلين دوراً هاماً فى تكوين الأبصال على الأفرع المتكشفة عرضيا من زراعة الأوراق العصارية فى الليليم ويتوقف ذلك على وقت

التصنيع. وكان عدد الأشطاء التى كونت أبصال مرتفعاً عندما كان تركيز الإثيلين مرتفع خلال الأسبوعين الأولين من الزراعة. وإذا أقف التخليق الحيوى للإثيلين خلال هذه الفترة فإن تكوين الأبصال على النبيتات المتكشفة ينخفض، ويمكن بإضافة الإثيلين بتركيز ١-١٠ جزء/مليون جزء خلال ٣-٧ أيام الأولى من النمو تشجيع تكوين الأبصال.

٦. تكوين المركبات الثانوية

هناك بعض المواد الطيارة الأخرى مثل الميثان، والايثان، والاسيتالدهيد، والايثانول يتم إنتاجها فى مزارع الأنسجة تحت ظروف التنفس الموجودة بالمزرعة وتؤثر بدرجات مختلفة على النمو والتكشف. كما ينتج الإيثان عن الخلايا التى تتعرض للتجريح أو الإصابة، ووجد أن تكوين الأجنة الجسدية يثبط فى نخيل البلح والجزر بالمعاملة بالايثانول.

سادساً: المركبات عديدة الأمين ومنظمات النمو الثانوية

Polyamines & secondary growth regulators

يعتقد أن الخمس مجموعات التى تعمل كمنظمات نمو نباتية والتى سبق التحدث عنها قد لا تكون مسئولة مسؤلية مباشره عن تنظيم عمليات النمو فى النبات. لكن يتم ذلك عبر رسل ثانوية secondary messengers تقوم بتنظيم التعبير الجينى وتصنيع البروتينات وهذه المركبات تضم الأوليجوسكريد، والاستيرول، والانزيتول ثلاثى الفوسفات، والمركبات العديدة الأمين. لكن يعترض البعض على إضافة المركبات العديدة الأمين ضمن منظمات النمو الثانوية إذ تصنف كمجموعة مستقلة لأنها تلعب دور كبير وواضح كمنظم للنمو حيث تؤثر فى عملية تضاعف الحامض النووي والاستجابات المورفولوجية المختلفة (Bais & Ravishankar, 2002). وتحتوى كل النباتات الراقية على مركبات اليفاتية عديدة الأمين ذات وزن جزيئ منخفض ضرورية للنمو وأهمها putrescine, spermine, tetraamine.

ويعتقد أن هذه المركبات والتى توجد أما حرة أو مرتبطة ذائبة أو غير ذائبة تلعب دوراً فى مدى تأثير ظروف الإجهاد البيئى على النمو والتطور. ويكون مستوى هذه المركبات مرتفعاً فى مناطق النمو النشطة كالقمم النامية فى الأفرع والجذور والخلايا غير المتكشفة أو تلك التى دخلت للتو فى مرحلة التكشف. ولذا يرجع استجابة الأنسجة الحديثة لزراعة الأنسجة مقارنة مع الأنسجة البالغة إلى ارتفاع محتواها من تلك المركبات (Rey *et al.* (1994، أما (Bais *et al.* (2000 فيعتقد أن الإضافة الخارجية للمركبات عديدة الأمين تعمل على إعاقة فعل الإثيلين وبالتالى تزيد من استجابة النسيج فى مزارع الأنسجة. كما ثبت تخليق هذه المركبات فى الأنسجة النباتية المنزرعة معمليا، وتعمل على استحثاث فعل منظمات النمو. يتم التصنيع الحيوى لهذه المركبات من بعض الأحماض الأمينية مثل الآرجينين ويختلف مسار التصنيع باختلاف الأنواع وما إذا كان هناك نمو وتكشف أم لا، وتنشط الإنزيمات المصنعة لها مثل ornithinedecarboxylase أثناء انقسام الخلايا وبينما ينشط أنزيم arginine decarboxylase أثناء استطالة الخلايا. ويتأثر التصنيع بمكونات البيئة فيزيد تصنيع putrescine عند إضافة أملاح الأمونيوم بالمقارنة مع النترات، والمواد المثبطة للإنزيمات السابق ذكرها تثبط النمو والتكشف .(Cou'ee *et al.*, 2004)

وقد وضح (Moshkov *et al.* (2008 الدور الذى تقوم به المركبات عديدة الأمين فى مزارع الأنسجة فيما يلى:

١. تعمل المركبات عديدة الأمين ككاتيونات وترتبط بقوة بالأحماض النووية والبروتينات التى تحمل شحنة سالبة. وتعمل بذلك على ثبات الأحماض النووية المرتبطة بها فتكون أكثر مقاومة لإنزيمات التحلل والحرارة.
٢. قد يكون لها نفس دور البوتاسيوم والكالسيوم والماغنسيوم فى النبات.
٣. لها دور فى ثبات الرقم الهيدروجينى للبيئة، وفى الظروف الحامضية يزيد تركيز الألومنيوم من التخليق الحيوى لـputrescine.

٤. ربما ترجع زيادة النمو بإضافة هذه المركبات إلى مقدرتها على الارتباط بمجموعات الفوسفولبيدات وبعض المركبات الأخرى فى الغشاء الخلوى مثل السكريات العديدة التسكر والأحماض الأمينية.
٥. تحور فعل بعض الإنزيمات وتزيد من تضاعف وترجمة الحامض النووى، وتكون أيضاً ضرورية لتحويل trna من الحالة غير النشطة إلى الحالة النشطة.

هناك تداخل لهذه المركبات مع منظمات النمو فإضافة المركبات عديدة الأمين إلى مزارع الأنسجة يكون لها تأثير مشابه للاكسين فى انقسام الخلايا واستطالتها وفى بعض الحالات يمكن أن تحل محل الأوكسينات. ويعتقد أن كلاهما يعمل معا فى الغشاء الخلوى مع أيون الكالسيوم فتشجع تخليق أنزيم البيروكسيديز بالأوكسينات يعتمد على وجود الكالسيوم. لكن المركبات عديدة الأمين تسبب سرعة خروج أيون الكالسيوم من الغشاء الخلوى وتثبط التخليق الحيوى وفعل الإثيلين وبالتالى تؤخر ظهور الشيخوخة فى معلق خلايا الورد بفعل الإثيلين (Muhitch *et al.*,1983). والإثيلين نفسه ممكن أن يقلل من معدل التخليق الحيوى للبولى أمين باختزال نشاط أنزيم الارجينين ديكربوكسيليز. وإيقاف التخليق الحيوى للإثيلين باستعمال بعض المواد مثل AVG يزيد من تخليق spermine واستعمال مثبطات تخليق المركبات عديدة الأمين قد تؤدى إلى زيادة أو نقص فى تخليق الإثيلين. فى أصناف البسلة المتقزمة يزيد GA_3 من الأرجينين ديكربوكسيليز مما يؤدى إلى زيادة تركيز المركبات عديدة الأمين فى الأنسجة. وتتباين كمية البولى أمين فى السلالات المختلفة حسب طول السلاميات ومحتواها من GA_3 ويؤدى التثبيط الحيوى لتخليق المركبات عديدة الأمين إلى قصر السلاميات فى السلالات المتقزمة (Smith *et al.*,1985). وبالرغم من ذلك يبدو أن المركبات عديدة الأمين تؤثر فقط فى انقسام الخلايا لكن الجبريلينات تؤثر فى النمو بزيادة معدل استطالة وانقسام الخلايا، وبذلك يمكن القول أن البولى أمين يساهم جزئيا فى عمليات النمو.

وجد أيضا أن السيتوكينيات تؤدى إلى زيادة فى التخليق الحيوى للبولى أمين ويرجع ذلك إلى تنشيط أنزيم الارجينين ديكربوكسيليز. وكما هو الحال فى فعل السيتوكينيات تؤدى المركبات عديدة الأمين إلى تأخير الشيخوخة. ويفسر البعض تأخير الشيخوخة بالمعاملة بالسيتوكينيات إلى زيادة محتوى الأنسجة من المركبات عديدة الأمين والتى تعمل على ثبات الغشاء الخلوى ضد إنزيمات التحلل ومنع أكسدة اللبيدات وهدم الأحماض العضوية.

دور المركبات عديدة الأمين فى زراعة الأنسجة

١. تكوين الكالس

تشجع المركبات عديدة الأمين انقسام الخلايا وتكوين الكالس ويزيد تأثيرها الإيجابى عندما تضاف مع منظمات النمو. وربما يرجع السببفى ذلك إلى تأثير تلك المنظمات على تصنيع الإثيلين. ولوحظ فعلاً تحسين فى نمو الكالس لعديد من النباتات بإضافة spermidine و spermine. والمركبات عديدة الأمين المرتبطة مع بعض الفينولات مثل أحماض cumaric وcinnamic تشجع من الانقسام الخلوى ويتوقف مدى التشجيع على التركيز المضاف منها، وهناك حد حرج بعده يثبط النمو. وقد وضحت دراسة Tang & Newton (2004) أهمية محتوى الكالس من المركبات عديدة الأمين فى اكتساب الكالس اللون البنى وبالتالى موته وعدم التكشف فى أشجار الصنوبر. وقد سجلا انخفاض putrescine و spermidine و spermine فى الأنسجة ذات اللون البنى بالمقارنة مع الكالسات السليمة بمقدار ٦٣.٨ - ٧١.٥ و ٤٧-٦٥.٥ و ٦٢.٣-٧٤.٥ % للمركبات السابقة على التوالى.

٢. التكشف

ينخفض تركيز مركبات البولى أمين خاصةspermine و spermidine بتقدم عمر النبات وقد يكون ذلك سبباً فى انخفاض قدرتها على التجذير والتكشف. كذلك أدت إضافة مثبطات تخليق المركبات عديدة الأمين إلى منع تكوين الجذور العرضية فى

الدخان، وقد شجعت تكوين الدرنات فى البطاطس بمنع تخليق الجذور العرضية (Bais & Ravishankar, 2002) لكن تشير بعض الأبحاث إلى عدم فاعلية المركبات عديدة الأمين فى تنشيط الجذور العرضية. وتؤدى زيادة معدل تخليق البولى أمين داخليا إلى تثبيط تكوين مبادئ الجذور على العقل والسويقة الجنينية العليا للفاصوليا المعاملة بـ IBA ويزيد تجذير هذه الأجزاء عند إضافة ٥٠ ميكرومولر من Spermidine فى وجود IBA. وتساهم المركبات عديدة الأمين فى إلغاء التأثير المثبط للضوء على تكوين الجذور.

٣. تكوين الأجنة الجسدية

أشارت بعض الأبحاث إلى أهمية المركبات عديدة الأمين فى تكوين الأجنة الجسدية، مثلاً وجد أن هناك زيادة فى معدل التصنيع الداخلى للمركبات عديدة الأمين أثناء تكوين الأجنة الجسدية فى الجزر البرى. وانخفض عدد الأجنة المتكونة بإضافة المواد المثبطة لتصنيع المركبات عديدة الأمين، وانعكس هذا التأثير بإضافة المركبات عديدة الأمين. ويتوقف تأثير الإضافة الخارجية على النوع النباتى والصنف المنزرع فقد أوضح Martinez*et al.* (2000) عند دراسة استجابة صنفين من البصل لتكوين نباتات أحادية من زراعة الأزهار فى بيئة محتوية على putrescine لمدة ١٥ يوم ثم نقلت بعدها إلى بيئة التكشف المحتوية على spermidine أن استجابتهما متباينة. وتشير النتائج المبينة فى جدول رقم (٣-٦) أن إضافة ٢ ميكرومولر من putrescine و ٠.١ ميكرومولر من spermidine كانت أفضل المعاملات فى إنتاج الأجنة الأحادية. وربما تكون النسبة بين spermidine و putrescine هى المنوط بها استحثاث تكوين الأجنة الجسدية فى أصناف الأرز المعروف بمقدرتها العالية على تكوين الأجنة الجسدية حيث كانت النسبة ٢.٣ أما بارتفاعها إلى ٣.٨ فتقل تلك القدرة، أما الأصناف التى كانت تلك النسبة فيها ١٠ فلم يكن لها القدرة على تكوين أجنة جسدية .(Shoeb *et al*., 2001)

جدول ٣-٦: تأثير إضافة putrescine و spermidine على تكشف الأجنة والأجنة الأحادية من زراعة أزهار الصنف Valcatorce INTA لنباتات البصل (Martinez *et al*;2000).

Putrescine	Spermidine	عدد الأزهار المنزرعة	عدد الأجنة المتكونة	% لتكوين الأجنة	عدد النباتات الأحادية المتكونة
ميكرومول					
٠.٠	٠.٠	٣٠١	٣	٠.٩	١
٠.٠	٠.١	٣٣٠	٤	١.٢	٢
٠.١	٠.٠	٢٩٨	٤	٢.٣	٣
٠.١	٠.١	٣١٣	٥	١.٦	٣
٠.٥	٠.٠	٢٩٥	٣	١.٠	٢
٠.٥	٠.١	٢٥١	٧	٢.٨	١
١.٠	٠.٠	٢٩٠	٢	٠.٧	٠
١.٠	٠.١	٢٦٣	٥	١.٩	٠
٢.٠	٠.٠	٢٦٨	٢	٠.٧	٤
٢.٠	٠.١	٣٠٥	٦	٢.٠	٠
المجموع		٢٩١٤	٤٤	١.٥	١٦

سابعاً: الاليجوسكريد Oligosaccharides

وهى عبارة عن سكريات معقدة تخلق طبيعياً فى الأنسجة النباتية وتتكون من إثنين أو أكثر من السكريات الأحادية، ويعتقد أن لها دور منظم فى ميكانيكية عمل الخلية، وتعتبردرجة تعدد السكريات المكونة لها عامل أساسى فى تحديد نشاطها الوظيفى. ويتأتى دورها المنظم لعمل الخلية عندما تتحرر من الجدار الخلوى بواسطة إنزيمات التحلل

المائى التى تنشط عند تغيير الرقم الهيدروجينى للجدار أو بوجود منظمات النمو التى تلعب دور فى تغيير الرقم الهيدروجينى مثل الأوكسينات أو السيتوكينينات. من المعروف أن إنزيم β-1,3 glucanase هو المسئول عن استطالة جدار الخلية والذى يلاحظ نشاطه أو تثبيطه أحياناً عند معاملة الخلية بالأوكسين أو السيتوكينين. وتعمل مركبات الاليجوسكريد على استطالة الجدر الخلوية و انقسامها بطريقة مماثلة لفعل IAA وإضافتها مع الأوكسين تشجع من عمله أو تثبطه اعتماداً على التركيزات المضافة من كليهما والرقم الهيدروجينى للوسط. وتنظم مركبات ألاليجوسكريد عمليات التكشف، وقد اقترح أن الاليجوسكريد المتحررة من القمم النامية هى المسئولة عن السيادة القمية وتثبيط نمو البراعم الإبطية عند حركتها لأسفل.

ثامناً: الأسترولات Sterols

تشجع بعض المركبات الاستيرولية مثل Stigmasterol و فيتامين D2 و D3 والتى تعتبر ضرورية للنمو الطبيعى للعظام فى الثدييات تكوين الأشطاء فى بعض النباتات مثل التفاح والكريز. لكن أدت الزراعة لفترات طويلة فى بيئة محتوية على فيتامين D3 بتركيز ١٠ ملجم/ لتر إلى إصفرار الأوراق. كذلك أمكن استحثاث تكوين الجذور فى بعض النبيتات بتركيزات منخفضة من فيتامين D3 لا تتجاوز ٠.١ ملجم/ لتر، ولم يكن للتركيزات العالية نسبياً تأثيراً ضاراً. وكان تأثير فيتامين D2 و D3 على تكوين الجذور تأثيراً مساعدا أو إضافياً للأكسين. وتأثر عدد الجذور المتكون على العقلة بعمر العقلة وتركيز المواد المضافة. وهناك بعض الدلائل على أن فيتامينى D2 و D3 يقللان من نشاط إنزيم البيروكسيديز فى الأنسجة المعاملة مما يحافظ على IAA من الهدم. هذا ويتوقف التصنيع الطبيعى لهذه الفيتامينات على التعرض للأشعة فوق البنفسجية (Moshkove *et al.*, 2008).

تاسعاً: الفحم المنشط Activeted charcoal

الفحم المنشط عبارة عن كربون موزع فى تنظيم خاص يضمن وجود شبكة كبيرة جداً من الثقوب الدقيقة التى تضمن مساحة سطح وحجم كبير جداً تمكنه من قدرة امتصاص فريدة. ويختلف الفحم المنشط عن الكربون الأولى بعدم وجود الشوائب غير الكربونية وأكسدة سطح الكربون. ويتم الحصول على الفحم المنشط والذى يستعمل لإدمصاص الغازات فى أغراض عدة بكربنة الخشب فى وجود الماء أو البخار واستعمال درجات حرارة عالية، وبذلك تتكون أسطح إدمصاص داخلية واسعة. وينصحفى مزارع الأنسجة باستعمال الفحم المنشط المصنع من أصل نباتى حيث يحتوى على أسطح نشطة بنسب أعلى من تلك الموجودة فى الفحم حيوانى بحوالى ٩٥-٩٩%. وتتوقف خصائص الفحم المنشط على الطريقة التى حضر بها، فليس لكل الأنواع التجارية نفس الخصائص والتأثيرات الفسيولوجية. وتشير التحليلات الكيميائية إلى احتواء الفحم المنشط على بعض أيونات العناصر مثل الحديد والنيكل والألومنيوم. لكن ليس من المعلوم ما إذا كانت هذه الأيونات تؤثر فى النمو أم لا. يضاف الفحم المنشط الناعم إلى بيئة النمو شبه الصلبة أو السائلة لإعطائها بعض المميزات فى مراحل معينة من النمو. وبالرغم من أن الفحم المشط لا يعتبر ضمن منظمات النمو إلا أنله من الخصائص حتى عند استعماله بتركيزات غير عالية نسبياً (تتراوح بين ٠.٢-٣% وزن/حجم) ما قد يعادل فعل منظمات النمو وبعض المكونات الأخرى فى البيئة. وتعتمد معظم التأثيرات الفسيولوجية للفحم المنشط على قدرته على إدمصاص مدى واسع من المركبات التى تكون مثبطة للنمو غالباً. ومن أهداف استعمال الفحم المنشط فى زراعة الأنسجة ما يلى:

١. يساعد على إمتصاص المواد السامة التى توجد فى البيئة مثل مشتقات الفينول والتىتسبب تلون البيئة باللون الأسود أو البنى وتلك مواد سامة للنسيج المنزرع خصوصاً عند بدء تأسيس المزرعة كما فى نباتات البلارجونيوم. وكذلك المركبات التى تتكون أثناء التعقيم مثل مركب 1,5-hydroxymethy-furfural (HMF) والذى ينتج من تعقيم السكر فى وسط مائل للحموضة (Pan & Van Staden, 1998)، وهو

مركب مثبط لتكوين الأجنة الجسدية من متك الدخان. كما يستعمل الفحم المنشط لإدمصاص الأحماض الدهنية المثبطة للنمو والتى توجد فى بعض الأنواع التجارية غير العالية النقاوة من الآجار.

٢. يدمص الفحم المنشط بعض المواد العضوية مثل منظمات النمو ولهذا الهدف يستعمل بتركزات تتراوح بين ٠.١ إلى ١% وزن/حجم للبيئة المستعملة، لإزالة الأوكسينات والسيتوكينينات وكذلك ABA من البيئة. لكن يجب الإشارة إلى صعوبة تحديد التركيز المتاح من منظمات النمو فى البيئة التى اضيف إليها الفحم المنشط. ويعتقد البعض أن المواد التى تدمص على أسطح الفحم المنشط كالعناصر الغذائية ومنظمات النمو، وكذلك بعض المواد التى توجد طبيعياً فى تركيبه يعاد إنسيابها للبيئة مرة أخرى للبيئة (Johansson *et al*., 1990). هذا وقد استعمل الفحم المنشط مع GA_3 لتشجيع إنتاج الأشطاء فى *Prunus*. لكن يجب الأخذ فى الاعتبار أن التركيزات العالية من الفحم المنشط تجعل منظمات النمو الموجودة فى البيئة غير ميسرة للإمتصاص، فعند استعماله بتركيز ٣% لإزالة اللون الأسود من الوسط المستعمل لنمو أنسجة نخيل البلح كان من الضرورى رفع تركيز 2,4-D المستعمل بمعدل ٥- ٢٠ مرة لإعطاء نفس الأثر الوظيفى فى تكوين الأجنة الجسدية. وبالطبع فإن الفحم المنشط له قدرة عالية على إدمصاص الإثيلين مما يقلل من تأثيره الوظيفى فى الأنسجة المنزرعة.

٣. يدمص الفحم المنشط بعض المغذيات العضوية مثل حامض النيكوتينك والفوليك وربما يعمل على إزالة بعضها تماماً من الوسط لكن لا يدمص الميوانوزيتول.

٤. يعمل الفحم المنشط على رفع الرقم الهيدروجينى لبيئة MS بعد التعقيم وأثناء تخزين البيئة بعد التعقيم لمدة ١٤ يوم بمعدل ٠.٧٥ وحدة عند إضافته بمعدل ٠.٥%. ويرجع ذلك إلى قدرته على إدمصاص الكاتيونات. وقد ترجع بعض تأثيرات الفحم المنشط على النمو والتكشف إلى التغيير فى الرقم الهيدروجينى. وقد أشار Eymar *et al*. (2000) أن الرقم الهيدروجينى للبيئة غير المحتوية على الفحم المنشط والمستعملة لزراعة نباتات التمرحنة *Lagerstroemia indica*، إنخفض بمقدار ١.٠٣ وحدة أما تلك المحتوية على الفحم المنشط فقد إرتفع رقمها الهيدروجينى بمقدار ٠.٣٨. وقد أدى إنخفاض الرقم الهيدروجينى إلى عدم إمتصاص أيون النترات المفترض امتصاصه فى المرحلة الأولى من الزراعة، وإمتص أيون الأمونيا. وأدى ذلك إلى تغيير فى درجة التوصيل الكهربى للبيئة، حيث انخفض أثناء الزراعة فى البيئة المحتوية على

الفحم المنشط وزاد فى البيئة الخالية منه بشرط عدم وجود BA. ويعتبر انخفاض درجة التوصيل الكهربى مؤشراً على إمتصاص المغذيات من البيئة.

٥. يشجع تجذير العقل وقد يعزى ذلك إلى منع الضوء الذى يثبط التجذير وتشجع تفاعلات الظلام. وإن كان الأمر كذلك فيمكن توفير الظلام حول الجزء المحتوى على بيئة النمو من الوعاء بلفه بورق ألومنيوم أو إضافة طبقة سطحية من الفحم غير المنشط.

٦. تشجيع التكشف وبالذات للأجنة الجسدية والنباتات الأحادية من زراعة المتك لبعض الأنواع مثل نباتات Anemone وكذلك تكشف الأشطاء فى بعض الأنواع، فعلى سبيل المثال لم تتكشف أى أشطاء من زراعة الأوراق الحرشفية لأبصال *Lilium longiflorum* إلا بعد إضافة ١% وزن/حجم من الفحم المنشط، لكن يتوقف التأثير على الموضع المأخوذ منه الجزء النباتى.

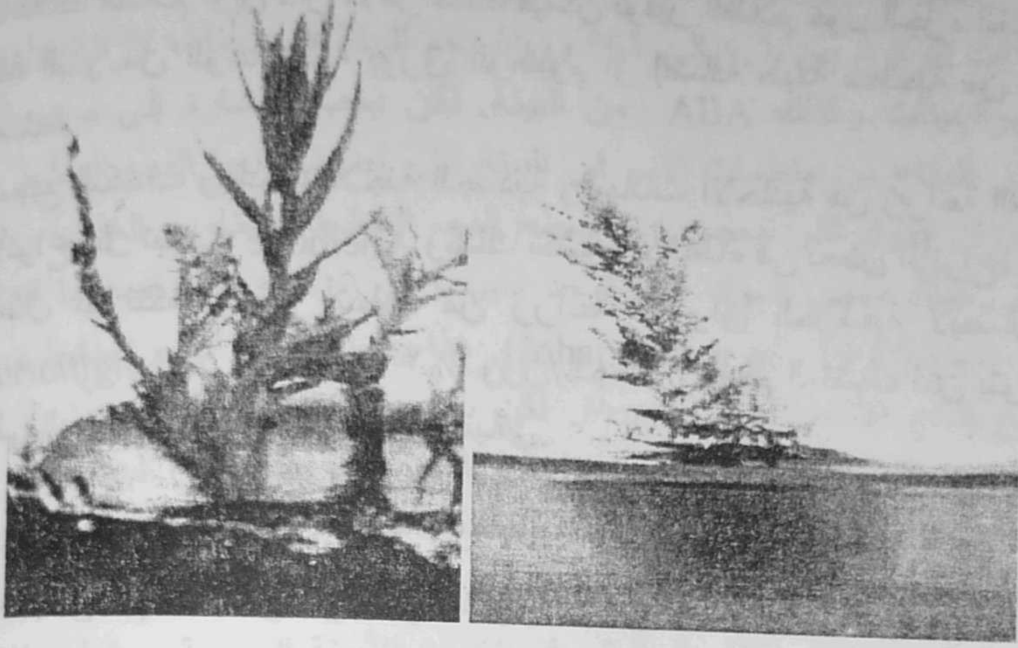
مما سبق يلاحظ أن إضافة الفحم المنشط إلى بيئة النمو يكون له فى غالب الأمر تأثير إيجابى فى التخلص من المواد الفينولية التى تسبب تلون البيئة باللون الأسود أو البنى (شكل رقم ٣-١٧) وإحداث سمية للنسيج المنزرع وإنخفاض نسبة نجاح تأسيس المزرعة. وقد وجد Alkhubry (2008) أن إضافة الفحم قد سببت زيادة فى معدل تكشف وعدد أشطاء التين المتكشفة من زراعة العقد الساقية (شكل رقم ٣-١٨). لكن قد يكون للفحم المنشط تأثير سلبياً على تركيز وفاعلية منظمات النمو وبعض المكونات الأخرى للبيئة، لذا اتجه بعض الباحثين كما أشار Pierik (1987) إلى استعمال طرق أخرى التخلص من المواد الفينولية ومنها:

١. غسيل الجزء النباتى بعد التعقيم السطحى بمحلول محتوى على مركب diethyl-dithiocarbonate (DIECA) بتركيز ٢جم/لتر لمنع أكسدة الفينولات. أو على الأقل غمس الجزء النباتى بعد إعداده فى ماء قبل وضعه فى البيئة.

٢. إضافة مادة PVP عديدة البلمرة بتركيز يتراوح بين ٠.٢٥-١ جم/لتر.

٣. إضافة مضادات الأكسدة مثل أحماض الستريك، الاسكوربيك لمنع أكسدة المواد الفينولية. أو إضافة الأحماض الأمينية الجلوتامين والآرجنين والأسبرجين.

٤. إستعمال البيئة السائلة لتقليل تركيز المواد السامة فى المنطقة المحيطة بالنسيج، أو نقل المزرعة إلى بيئة شبه صلبة جديدة على فترات متقاربة.
٥. الاقلال من الضرر أى، التجريح الحادث للجزء النباتى أثناء إعداده.



شكل ٣-١٧: على اليمين تأثر المُستأصَل النباتى لأشجار العرعر *Juniprus communis* بالمواد الفينولية المفرزة من النسيج، وعلى اليسار نجاح النمو بإضافة الفحم الى البيئة.



شكل ٣-١٨: على اليمين عدم تكوين أشطاء عرضية على العقد الساقية للتين فى بيئة خالية من الفحم النباتى ، وعلى اليسار تكوين مزيد من الأشطاء بإضافة ٢ جم/لتر من الفحم النباتى للبيئة.

عاشراً: الأثر الوظيفى للتجريح The physiological effect of wound

أثناء فصل الجزء النباتى لابد من إحداث تجريح له، على الأقل يتمثل ذلك فى قطع الساق لفصل القمة النامية، أضف إلى ذلك الجروح والخدوش البسيطة التى تحدث دون قصد باستعمال الأدوات المختلفة. ولهذه الجروح تأثيرات مشابهه لمنظمات النمو فبعضها مثبط للنمو وبعضها مشجع فيلاحظ أحياناً تكوين الكالس فى منطقة القطع دون أى أضافة هرمونية. لكن حقيقة المواد المتكونة بسبب التجريح مازالت غير معروفة على وجه الدقة. فعلى سبيل المثال يكون للأجزاء النباتية المفصولة من النبات حساسية أعلي للأكسين من النباتات الكاملة ولا يعرف بالضبط سبب ذلك وإن كان يعتقد أن السبب يرجع إلى حدوث الجروح إما بطريقة مباشرة أو غير مباشرة بافتراض أن هناك هرمون يخلق فى منطقة الجرح. وقد افترضت هذه النظرية أولا من قبل Haberlandent فى سنة ١٩٢١ حيث لاحظ أن انقسام خلايا البطاطس الموجودة عند مكان الجرح ينخفض إذا تم غسل الجرح بالماء عدة مرات وبإضافة خلايا مهروسة إلى منطقة الجرح مرة أخرى شجع انقسامها بشدة. واقترح أن هرمون الجروح يتفاعل مع منظم نمو آخر غير معروف موجود بأنسجة البطاطس. وقد يكون للجروح تأثير مثبط أو مشجع لمزارع الأنسجة كما يتضح مما يلى.

١. التأثير المثبط

تعيق الجروح وبعض الإجهادات البيئية الأخرى بصورة مؤقتة قدرة الخلايا المجاورة على تنظيم إستبدال الهيدروجين والبوتاسيوم خلال الغشاء الخلوى ويفقد البوتاسيوم مبدئيا من الأنسجة المجروحة، مما يؤثر على ثبات الضغط الاسموزى للخلية. كذلك يحدث تكسير سريع للبيدات الموجودة فى الأغشية الخلوية بتأثير تنشيط إنزيمات الأكسدة وتحلل اللبيدات. وتؤدى هذه الإنزيمات إلى تكوين الشوارد الحرة الضارة بالأنسجة والتى ربما تسبب الكثير من الضرر أثناء تأسيس المزرعة (Dan 2008).

وتمتلك النباتات الكاملة والأنسجة المفصولة منها أحياناً وسائل حماية ضد هذه الشوارد الحرة، فيلاحظ زيادة نشاط إنزيم البيروكسيدز الذى يقلل من فعل الأكسدة بالشوارد الحرة. ويزيد معدل وجود الشوارد الحرة أثناء عزل البروتوبلاست بسبب استعمال إنزيمات هدم مكونات الجدار الخلوى ويمكن تقليل الضرر الحادث أثناء عزل البروتوبلاست باستعمال superoxide dismutase أو مضادات الأكسدة مثل n-propylgallat. ويبدو أن الأكسجين النشط يعمل على نشاط إنزيمات الأكسدة لمكونات الجدار الخلوى وتعمل مضادات الأكسدة على ثبات مكونات الجدار بتثبيط إنزيمات lipoxygenase. وقد لاحظ Emek & Erdag (2007) أنه يمكن التغلب على المواد الفينولية التى تسبب موت المُستأصَلات النباتية بتقسيم أبصال الجلاديولس طولياً وليس عرضياً. كما تستحث الجروح تكوين الإثيلين بتشجيع تحويل ACC إلى الإثيلين اعتماداً على وجود Superoxide وتعمل مضادات الأكسدة المضافة على تثبيط هذا التحول. كذلك فإن المركبات عديدة الأمين يكون لها قدرة على تثبيط فعل الشوارد الحرة. ويلى عملية التجريح مباشرة تثبيط سريع فى نمو الخلية وفقدان القطبية، لكن تستعيد الخلية تلك الخصائص عند غسل الجرح مما يؤكد وجود مواد مفرزة من الجرح تعطى هذا التأثير ،ويعتمد ذلك على النوع النباتى (George, 1993).

٢. التأثير المشجع

وفى المقابل فإن للجروح تأثيرات إيجابية ويعزى ذلك إلى أن التجريح يستحث حركة الهرمونات الداخلية وانتقالها إلى مكان الجرح وذلك كأحد ميكانيكيات الدفاع والمقاومة ضد الأضرار الميكانيكية أو المسببات المرضية. وطبقا لهذه النظرية يعتقد أن التكشف يتم عندما يحدث إتزان بين منظمات النمو الداخلية والخارجية أى أن الجرح يضمن زيادة تركيز الهرمونات الداخلية فى هذه المنطقة للحد الضرورى للتكشف. وتتضمن التأثيرات الإيجابية للجرح تكوين الكالس فبالرغم من أن المواد الناتجة من

التجريح تكون مثبطة فى معظم الحالات إلا أن بعض النتائج أشارت إلى التأثير المشجع لها على تكوين الكالس. فعند حدوث جرح أو إعداد العقل تفرز بعض المواد في مكان القطع. يكون لها تأثير مشجع للنمو متمثلا فى تكوين الكالس أو نسيج الكامبيوم فى مكان الجرح. ولوحظ أيضاً تأثير الجرح عند فصل الجزء النباتى وزراعته حيث يحدث انقسام للخلايا مؤدياً إلى تكوين الكالس. وكلما كانت مساحة السطح المقطوع أكبر كان ذلك ادعى لتكوين كمية أكبر من الكالس لذا يعمد البعض إلى إحداث المزيد من التجريح للنسيج لإعطاء كالس أكبر. وربما يشجع التجريح تكشف الأشطاء فمن المعروف أن إحداث جرح فى قاعدة الأشطاء قبل زراعتها .من العوامل التى تساعد فى تكون البراعم العرضية عليها، وغالباً يكون هناك ارتباط موجب بين التجريح وتكوين البراعم العرضية، مع ملاحظة أن ذلك لا يؤدى إلى زيادة معدل إمتصاص السيتوكينينات من البيئة.

كذلك فإن إحداث تجريح عرضى فى العرق الوسطى لأوراق بعض النباتات مثل *Streptocarpus, Begonia, Saintpaulia,* أدى إلى زيادة عدد البراعم المتكونة. وعند تثقيب أوراق هجين *Populua nigra x P. maximowiczii* بدبوس قبل زراعتها حدثت زيادة فى عدد الأشطاء المتكونة، وكان أعلى معدل لها عند إحداث خمسة ثقوب فى الورقة مع وضعها مقلوبة على سطح البيئة. وتكونت البراعم العرضية حول مناطق التجريح أما الأوراق غير المثقبة فتكونت عليها البراعم فى مناطق القطع الخارجية فقط. وقد قام Phelan *et al.* (2007) بعمل جرح عرضى أو طولى على قواعد المُستأصَلات النباتية لأبصال *Tulbaghia violacea* قبل زراعتها وقد لاحظ أن معدل تكوين النباتات كان ٢.٤ وكانت نسبة النباتات ذات الأوراق المخططة عند عمل جرح عرضى٣٥%، بينما كان معدل تكوين النباتات ٢.٥ ونسبة النباتات المخططة ٧١% عند عمل جرح طولى. ولم تكن البراعم الجانبية لنباتات تابعة لجنسOpuntia حساسة للسيتوكينينات أو الأوكسينات فى البيئة لكن بإحداث تجريح فى المُستأصَل النباتى حدثت استجابة لـNAA

و BAP ونمت الأشطاء الجانبية (Lazcano *et al.*, 1997). كذلك فإن شق القمة النامية فى بعض النباتات طوليا إلى جزئين يؤدى إلى زيادة فى نمو الأشطاء الجانبية. وكانت هذه المعاملات فعالة أيضاً فى نباتات *Yucca galuca* بينما لم يكن لأى من هذه المعاملات تأثير فى *Yucca elephantipes*.

الفصل الرابع

مراحل زراعة الأنسجة وبعض العوامل المؤثرة عليها

حدد Murashige ثلاث مراحل لعملية زراعة الأنسجة وقد لاقى هذا التقسيم قبولاً لدى المهتمين بعلم الإكثار الدقيق، لأنه لا يصف فقط مراحل زراعة الأنسجة لكنه يحدد النقاط التى يجب عندها تغيير ظروف النمو لتحقيق الهدف المرغوب من المزرعة. وبعد فترة من نشر Murashige هذا التقسيم تم إضافة مرحلتين جديدتين الأولى قبل تلك المراحل الثلاثة والأخرى فى نهاية تلك المراحل فأصبح عددها خمسة. وتختلف الاحتياجات الضرورية لاستيفاء متطلبات كل مرحلة باختلاف نوع المزرعة ونوع النبات، وعوامل أخرى تتعلق بالنبات الأم والمُستأصَل النباتى. ويلاحظ أيضاً أن هذه المراحل قد تتداخل مع بعضها البعض وقد لا تتضح كل المراحل فى بعض أنواع المزارع (George, 1993). ويبين شكل رقم (٤-١) مراحل إنتاج نباتات الخيار بزراعة الأنسجة كنموذج للإكثار المعملى، وتلك المراحل هى:

١. المرحلة الأولى: اختيار وتجهيز النبات الأم

وقد يطلق عليها مرحلة الإعداد وأيضاً المرحلة صفر، فقبل البدء فى زراعة الأنسجة يجب الاهتمام باختيار النبات الأم المستعمل كمصدر للمُستأصَل النباتى بدقة. فلابد أن يكون النبات مطابق فى صفاته للصنف أو النوع المراد إكثاره، وخالى من الأعراض المرضية المختلفة والإصابات الحشرية. وقد تتم معاملة النبات الأم أو الجزء المستعمل كمصدر للأنسجة فى هذه المرحلة ببعض المعاملات التى تهدف إلى خفض التلوث الميكروبى أو تحسين النمو والتكشف فى الخطوات التالية. فقد تُعامل النباتات ببعض المضادات الحيوية أو المبيدات الفطرية وسيتم توضيح ذلك فى الفصل الخامس. ويشير Leifert & Cassells (2001) إلى أهمية إجراءاختبار معامل المرض لبعض المسببات المرضية. ولعل من الضرورى مقاومة الحشرات لأنها ناقل أساسى للكثير

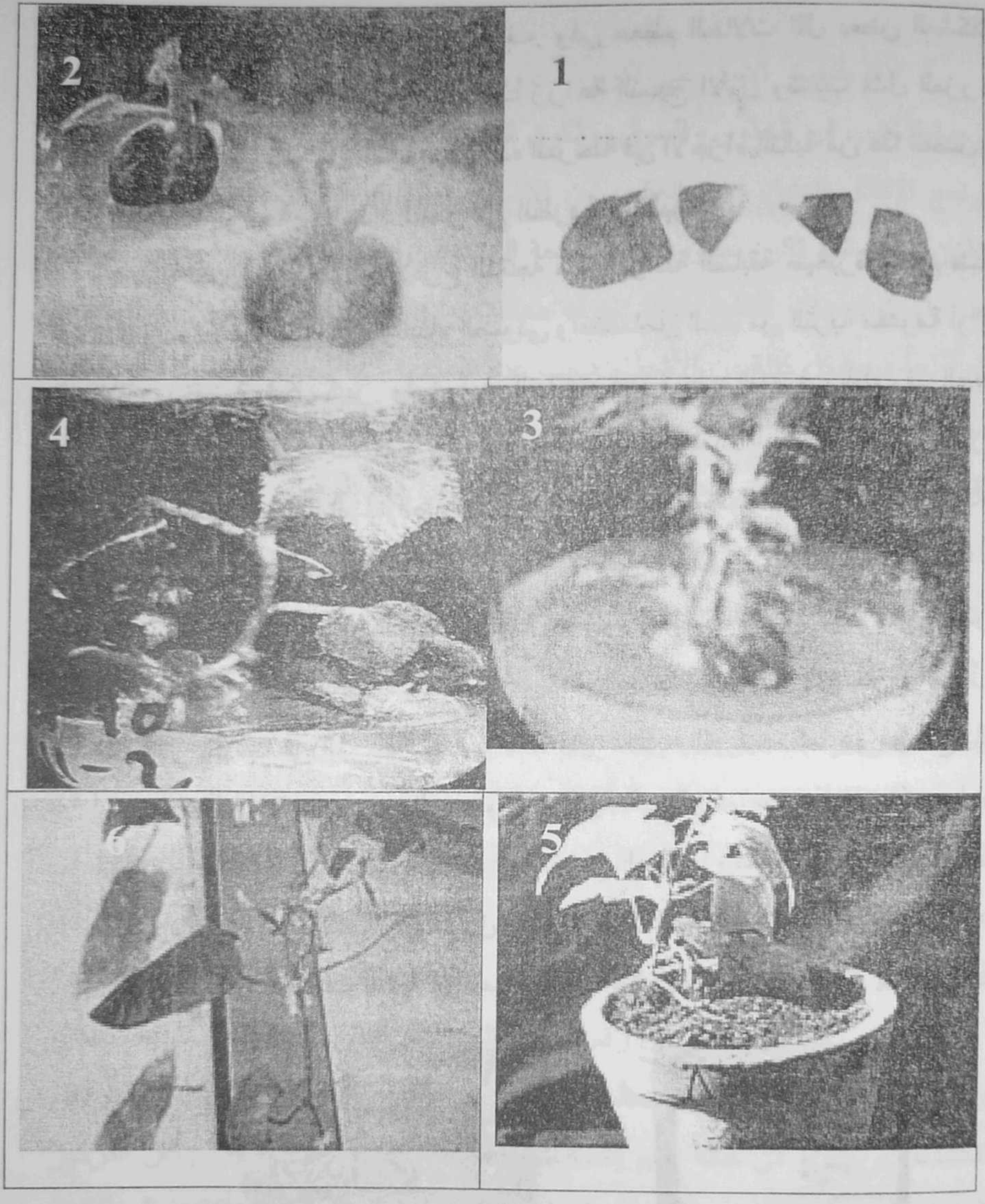
من الجراثيم وبعضها قد يضع البيض داخل أنسجة النبات ليفقس عقب تأسيس المزرعة والإعداد الجيد فى هذه المرحلة يرفع من نسبة نجاح المزرعة ويقلل من تكاليف الإنتاج.

٢. **المرحلة الثانية: تأسيس المزرعة المعقمة**

بعد اختيار النسيج المناسب وإعداده الإعداد الجيد تأتى الخطوة التالية ذات الأهمية القصوى فى زراعة الأنسجة ألا وهى عزل المُستأصل من النبات وتعقيمه تعقيماً سطحياً للتخلص من التلوث السطحى وبدون التأثير على حيوية النسيج. ثم ينقل المُستأصَل إلى الوسط الغذائى الملائم الخالى من مظاهر التلوث. ويترتب على ذلك غالباً نمو المُستأصَل النباتى بإحدى الصور المختلفة للنمو كالزيادة فى الحجم أو تكوين الكالس أو الأجنة الجسدية. وأى نسيج أو بيئة تصاب بتلوث فى هذه المرحلة يجب استبعاد الوعاء المحتوى عليه وتعقيمه قبل التخلص منه، وغالباً يمكن التحقق من وجود التلوث بعد ٣-٥ أيام من الزراعة. ويقاس نجاح هذه المرحلة بمدى الحصول على أنسجة غير ملوثة لها القدرة على مواصلة النمو. وسوف تناقش هذه المرحلة بالتفصيل فى الفصل التالى.

٣. **المرحلة الثالثة: استيلاد النباتات**

الهدف من هذه المرحلة هو تكوين أفراد جديدة من المُستأصَل النباتى أو ما يعرف باستيلاد نباتات جديدة. وهذه النبيتات plantlets يمكن فصلها من المزرعة ونقلها إلى وسط جديد حيث تستمر فى النمو وتعطى نباتاً كاملاً. وكما سبق الذكر فى الفصل الأول تتعدد صور نشوء تلك النبيتات فقد تكون أفرع تكشفت من براعم موجودة سابقاً على النبات الأم أو من براعم عرضية تكونت على المُستأصَل النباتى. كما تتطور النبيتات أيضاً من الأجنة الجسدية أو من البراعم المتكونة على الأجزاء الخضرية المخزنة للمواد الغذائية كدرينات البطاطس. وقد تستعمل النبيتات المستولدة كنسيج يعاد زراعته للحصول على نبيتات جديدة ويمكن تكرار ذلك عديد من المرات



شكل ٤-١: مراحل إنتاج نباتات الخيار باستعمال زراعة الأنسجة (١) مرحلة تأسيس المزرعة، (٢ و ٣) مرحلة استيلاد النباتات بتكوين البراعم العرضية، (٤) مرحلة الإعداد للنقل خارج المعمل، (٥) مرحلة أقلمة النباتات للظروف الطبيعية، (٦) نبات كامل مزهر بعد الأقلمة.

مالم يفقد المُستأصَل قدرته على التكشف. وفى معظم الحالات تقل بعض المشكلات كإفراز المواد الفينولية التى قد تصادف زراعة النسيج الأول وتسبب فشل المزرعة. وسوف نتعرض للعوامل المؤثرة فى هذه المرحلة فى الأجزاء التالية من هذا الفصل.

٤. المرحلة الرابعة: الإعداد للنمو فى الظروف الطبيعية

تكون النبيتات أو الأفرع الناتجة من المرحلة السابقة صغيرة الحجم ضعيفة التكوين وقدرتها على عملية البناء الضوئى وامتصاص الماء من التربة معدومة أو على الأقل منخفضة بشكل كبير. وليس لهذه النباتات القدرة على النمو فى الظروف الطبيعية فى البيوت المحمية. لذا فإن هذه المرحلة تتضمن إعداد النبيتات لتتحمل الظروف العادية والقيام بعملية البناء الضوئى. وقد تحتاج بعض النباتات إلى معاملات خاصة. فمثلاً النبيتات التى لها دور سكون كمعظم الأبصال والكثير من الأشجار الخشبية يجب كسر سكونها سواء بالبرودة أو استعمال بعض منظمات النمو. وقد اُقترح ضرورة تكوين الجذور أو منشأتها على الأفرع فى هذه المرحلة قبل نقلها إلى خارج المعمل لأن تلك التى تكونت فى المرحلة السابقة عادة غير عادية التركيب كما هو موضح بالشكل رقم (٤-٢) ولاتقوم بدورها الفسيولوجى. لكن على الرغم من هذا فإن تكوينها مؤشر جيد على إمكانية نجاح نقل النباتات إلى خارج المعمل. وهذه العملية مهمة جداً كجزء من برنامج الإكثار الخضرى الدقيق حيث تقدر تكاليف مرحلة تكوين الجذور بحوالى ٣٥-٧٥٪ من التكاليف الكلية لبرنامج الإكثار الدقيق (Debergh & Maene, 1981).



شكل ٤-٢: الجذور العرضية غير العادية فى مزارع الأنسجة (على اليسار) والجذور العادية أثناء عملية الأقلمة (على اليمين).

ولا يقتصر الأمر على تكوين الجذور بل من المهم أن يكون هناك ارتباط بين أوعية الخشب فى الجذور والسوق. وتكون النباتات العشبية عموما جذوراً بسهولة فى برامج الإكثار الدقيق على العكس من الأشجار والشجيرات. وهناك بعض النبيتات كالتين والطماطم تكون جذور دون الحاجة إلى تغيير فى مكونات البيئة رغم احتوائها على السيتوكينينات فقط وبدون إجراء معاملات خاصة لدفعها للتجذير. وإذا كانت المزرعة فى شكل كتلة من الأشطاء فيجب عدم تقسيمها إلى أشطاء فردية إلا بعد تكوين الجذور. وفى بعض الحالات قد يفشل برنامج الإكثار تماماً لعدم تكوين جذور على النبيتات الناتجة وبالتالى تموت النباتات عقب النقل من المعمل. وإن كانت النباتات الناتجة متقزمة فيجب دفعها للاستطالة باستخدام بعض منظمات النمو. وفى معظم الحالات يجب إتباع خطوات خاصة لدفع عملية التجذير.

ويتم دفع النباتات للتجذير بالمعاملة ببعض الأوكسينات أو نقل الأشطاء إلى بيئة ذات تركيز منخفض من الأملاح كاستعمال نصف أو ربع تركيز أملاح MS. كما يلعب تركيز الآجار والسكر فى البيئة وإضافة بعض المركبات عديدة الأمين دوراً فى عملية التجذير. وقد تمت مقارنة تجذير أفرع نباتات *Syzygium alternifolium* فى بيئة تحتوى على ٢% سكر و ٠.٨% آجار و ١٠ ملجم/لتر IBA وباستعمال تركيز من أملاح MS يتراوح بين صفر والتركيز الكامل، وأشارت نتائج Sha Valli-Khan *et al.* (1999) والموضحة بجدول رقم (٤-١) إلى تأثير ذلك على النسبة المئوية للتجذير وعدد الجذور وطولها. وقد لاحظ أهمية تركيز أملاح البيئة أثناء تكوين الجذور فلم تتكشف أى جذور فى حالة عدم إضافتها فضلاً عن اصفرار الأوراق. وكان التركيز المنخفض منها وهو ربع MS أفضل من التركيزات الأعلى. كذلك كانت البيئة شبة الصلبة أفضل من البيئة السائلة لتكوين ونمو الجذور حيث زاد عدد الجذور والنسبة المئوية للتجذير وطول الجذر بزيادة تركيز الآجار من صفر إلى ٠.٨%، لكن انخفضت قيم قياسات جميع هذه الصفات بزيادة تركيز الآجار عن ٠.٨%. وكان أفضل تركيز

للسكر هو ٣% حيث زادت النسبة المئوية للتجذير وعدد الجذور ومتوسط طول الجذور المتكونة زيادة طردية بزيادة تركيز السكر من ١-٣% أما التركيزات الأعلى ٤-٥% فقد أضعف تأثيراً سلبياً على هذه الصفات.

جدول ٤-١: تأثير تركيز أملاح MS على تجذير أفرع نباتات *Syzygium alternifolium* كما سجلها Sha Valli-Khan *et al.* (1999).

تركيز أملاح MS	متوسط طول الجذور (سم)	عدد الجذور/فرع	% للتجذير
٠.٠٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠
٠.٢٥	١.٠	٣.٠	٦٦.٦
٠.٥٠	١.٤	٢.٨	٦٢.٥
٠.٧٥	٠.٨	١.٧	٤٥.٨
١.٠٠	١.٠	١.٣	٣٧.٥

ويشير Arrebola *et al.* (1997) إلى إمكانية نقل الأشطاء المتكشفة في القوارير معمليا لنباتات *Isoplexis canariensis* إلى خارج المعمل بدون تكوين جذور وقد حصل على نسبة أقلمة تصل إلى ١٠٠% باستبدال البيئة التى استعملها فى أوعية الزراعة أثناء مرحلة التضاعف ببيت موس معقم وتم الرى بالماء المعقم لمدة ٨ أسابيع. وقد حفظت المزرعة خلال هذه الفترة فى نفس غرفة الزراعة لكن برفع الرطوبة النسبية إلى ٩٠-١٠٠%. نقلت الأشطاء بعد ذلك إلى صوانى زراعة مملوءة بالبيت موس فى البيت المحمى على درجة حرارة ٢٥° م ورطوبة نسبية ٥٠%. ثم نقلت الأشطاء بعد ذلك بصور فردية إلى أصص وكانت درجة الحرارة أثناء النهار ١٥° م وخلال الليل ٣° م والرطوبة النسبية ٤٠%. وفى بعض المعامل التجارية تتم عملية التجذير خارج المعمل عقب استطالة الأفرع وذلك لتقليل تكاليف الإنتاج. فعلى سبيل

المثال استطاع Bhatia *et al.* (2002) الحصول على نسبة تجذير ١٠٠% عند الإكثار الدقيق لنبات *Stackhousia tryonii* بغمس قواعد العقل الطرفية بعد غسل البيئة العالقة عليها فى محلول ٢ ملجم/لتر IBA ثم زراعتها فى تربة مكونة من الرمل والبيرليت بنسبة ٤ : ١ وحفظها فى غرفة مشبعة بالضباب ودرجة حرارة ٣٢° م لمدة أربعة أسابيع.

٥. المرحلة الخامسة: النقل للظروف الطبيعية

يعتبر نقل النبيتات من المعمل إلى البيت المحمى أو الحقل وهو ما يعرف بالأقلمة acclimatization أو adaptation عنق الزجاجة فى نجاح برنامج الإكثار الدقيق، ومن ثم سيتم الحديث عن هذه المرحلة وتأثير بعض العوامل المرتبطة بالظروف البيئية فى مزارع الأنسجة عليها فى الفصل التالى.

العوامل المؤثرة على النمو والتكشف فى مزارع الأنسجة

من المعلوم أن بكل خلية نباتية مخزون من المعلومات الوراثية الخاصة بجميع الصفات المميزة للنبات، لكن فى الظروف العادية لا يحدث تعبير لكل الجينات الموجودة فى الخلية فى ذات الوقت. ومن ضمن المعلومات الوراثية بالخلية تلك التى تمكن الخلية من أن تظل على صورة تطورية ظاهرية أو وظيفية محددة لعمر معين يطول أو يقصر حسبما تتغير الظروف المحفزة لعمل هذه الجينات. ويشير ذلك إلى أن الطرز المظهرى للخلية أو النبات بصورة عامة هو عبارة عن التفاعلى بين تركيبها الوراثى والعوامل البيئية. وعلى هذا يمكن لأى خلية تحت ظروف محددة تكوين نبات كامل حيث تعمل زراعة الأنسجة على استحثاث الجينات المنوط بها دفع الخلية للتكشف وإعادة تكوين نبات كامل أو عضو مختلف كأن يتكون جذر من خلايا الورقة من التعبير عن نفسها. وهذا التحفيز قد يكون عن طريق عوامل طبيعية أو كيميائية، لكن من

الغريب أن الخلايا فى نفس النسيج لا تستجيب بنفس الطريقة ويطلق على الخلية التى تستجيب لتلك المستحثات بـcompetent أى مؤهلة.

لكن حتى الآن هناك صعوبة فى دراسة لماذا هناك خلايا مؤهلة وأخرى غير مؤهلة حيث لا يمكن معرفة تلك الخلية إلا بعد استجابتها لمنظمات النمو وانقسامها لتتحول إلى صورة جديدة لا يمكن معها تحديد سبب استجابتها (Preece, 2008). وعلى هذا فإن فهم هذه الآلية عبر الدراسات الجزئية قد يمكن من حل مشكلة دفع النباتات أو الخلايا التى عرفت بعدم استجابتها لزراعة الأنسجة. وغالباً يكون هذا التعبير ثابت فى زراعة الأنسجة وينتقل من الأمهات إلى الأجيال الناتجة بالإكثار الخضرى.لكن بالتكاثر الجنسى للنباتات الناتجة من زراعة الأنسجة فإن هذه الصفات التى تم التعبير عنها نتيجة تنشيط بعض الجينات تختفى مرة أخرى، ويطلق على هذا التنشيط المؤقت للجينوم بالوراثة الفوقية epigenetic. ويعتبر ذلك لب عمليات الإكثار عموما وزراعة الأنسجة على الأخص (Hartmann *et al.*, 2002). ومن أمثلة الصفات التى أمكن تحفيزها معملياً والحفاظ عليها لمدة طويلة:

١. الصفات المظهرية المميزة لمرحلة النمو التى زرع فيها النسيج.
٢. التعبير عن الجنس فى الأزهار.
٣. تحفيز الخلايا على تكوين نوع واحد من الأعضاء.
٤. قدرة الخلايا على النمو والتكشف.
٥. عدم الحاجة إلى بعض الإضافات للبيئة مثل منظمات النمو فيما يعرف بـ habituation.

ومعظم صور التعبيرات الجينية يمكن أن تحفز أو تحور بتأثير المواد المضافة للبيئة خاصة منظمات النمو. وعلى هذا فإن الأنسجة التى تم تحديد وظيفتها أو شكلها بمعنى أنها تكشفت يمكن أن يعاد تكشفها مره أخرى إلى أعضاء جديدة أو تحولها إلى خلايا ميرستيمية أو كالس. لكن لو كانت الخلايا لا تملك تلك القدرة أو فقدتها - وهى من الاحتمالات الواردة أثناء زراعة الأنسجة أو إذا كانت الظروف البيئية غير ملائمة

فتبقى الخلية على حالتها السابقة دون تغيير، ويستمر النسيج فى النمو على حالته السابقة كأنه لم يفصل من النبات الأم. وقد تستمر قدرة الخلايا فى النمو والتكشف عدة أجيال فى زراعة الأنسجة ثم تفقد الخلية تلك القدرة والتى قد ترجع إلى حدوث طفرات تعوق استمرار ذلك.

إن عملية النمو والتكشف فى مزارع الأنسجة من العمليات المعقدة ويتحكم فيها العديد من العوامل. وتقسم هذه العوامل إلى عوامل وراثية، وهى بالطبع أهم العوامل فلو كان التركيب الوراثى لا يمتلك القدرة على النمو أو التكشف فى زراعة الأنسجة فلن تنجح زراعة الأنسجة لهذا النبات تحت أى ظروف. وهناك العوامل المتعلقة بالظروف البيئية من حيث الوسط الغذائى المستعمل والظروف البيئية المحيطة بالمُستأصَل النباتى. وقد انخرط الكثير من الدارسين لمزارع الأنسجة فى دراسة تأثير منظمات النمو لما تحدثه من تأثير واضح وسريع على استحثاث العوامل الوراثية لتكشف الخلية. وبالطبع فإن هذه العوامل تتداخل مع بعضها البعض مما يزيد من صعوبة الوصول إلى التوليفة المثلى من تلك العناصر لإكثار بعض النباتات، وسوف يتناول هذا الفصل هذه العوامل بالتفصيل.

أولاً: العوامل الوراثية

كما سبق القول تتوقف الاستجابات المختلفة للأنسجة المنزرعة معملياً على التركيب الوراثى للنبات بصفة أساسية. لكن من الغريب أنه يمكن استحثاث بعض الخلايا فى نفس النسيج بمعنى امتلاكها لمستقبلات منظمات النمو المشجعة على ارتداد الخلية للحالة الميرستيمية على العكس من غيرها، وليس من المعلوم حتى الآن لماذا توجد تلك المستقبلات فى خلايا دون غيرها(Preece, 2008). لكن الثابت أن معاملة تلك الخلايا بمنظمات النمو يدفعها لتخليق mRNA. وهناك العديد من الأمثلة التى تؤكد إمكانية زراعة أنسجة نوع معين أو صنف معين وربما سلالة دون صنف أو سلالة

أخرى شديدة الشبه بها، ويمكن الرجوع إلى المثال الذى ذكر عن التكشف فى بعض سلالات الطماطم بالفصل الثالث لتوضيح مدى التباين بين السلالات المختلفة. وقد وجد Lall *et al.* (2004) تباين فى قدرة سلالتين من نبات الارابدوبسس على تكوين أشطاء بالمقارنة مع الآباء لكن تم استعادة هذه القدرة فى النسل الناتج من تهجين السلالتين معا وذلك يعنى أن كلا السلالتين تمتلك جين معين يلعب دوراً فى عملية التكشف وهذ الجين مفقود فى السلالة الأخرى وعند تهجين فإن جينوم النسل الناتج يحتوى على الجينين المسئولين عن التكشف. وبتحليل الجينوم تم تحديد ثلاث مواقع جينية لصفات كمية على الكروموسومات رقم ١ و ٤ من أحد الآباء والثالث على كروموسوم رقم ٥ من الأب الآخر وكان أكثر تأثيراً فى عملية التكشف.

وقد أُرجعت الاستجابات الحادثة فى زراعة الأنسجة والتى قد تورث كصفات كمية أو غير وصفية أحياناً إلى جينات نووية أو سيتوبلازمية Decook *et al.*, 2006) &Wan *et al.* 1988). وقد تم تحديد عدد من الجينات المنوط بها لتحكم فى تكشف الأشطاء فى نباتات الارابدوبسس منها *cytokinin independent1* (*CKI1*) وعند تعبير هذا الجين يمكن تكشف الأشطاء من الكالس بدون إضافة السيتوكينين. ويعتقد أنه ينسخ إلى بروتين مسئول عن مستقبلات السيتوكينين فى الخلية، لكن الدراسات الفسيولوجية لم تؤكد ذلك. كذلك تم تعريف الجين ARR2 الذى يوجد فى نواة نفس النبات وهو يحفز الخلية للاستجابة للسيتوكينين (Lall *et al.*, 2004). وكأى صفة أخرى فإن هذه الصفات المتعلقة بالقدرة على النمو أو التكشف أو تكوين الكالس فى زراعة الأنسجة قد تكون سائدة سيادة تامة أو غير تامة أو متنحية أو لها تأثير إضافى كما يلعب التضاعف دوراً فى الاستجابة فنباتات البطاطس ثنائية التضاعف تكون أشطاء بمعدل أعلى من تلك الرباعية (Gahan & George, 2008) . تكون الكالس الجنينى عند زراعة الأجنة غير الناضجة لهجين *Vigna glabrescens* مع *V. radiate* لكن كان الكالس الناتج من زراعة الأجنة الناتجة من التلقيح العكسى غير

جنينى (Chen *et al.*, 1990) . وعموماً للنباتات المؤنثة استجابة مختلفة عن المذكرة التابعة لنفس النوع وغالباً تكون ذات مقدرة أعلى على التكشف فى زراعة الأنسجة.

وقد سجل Keyes *et al.* (1981) ارتباط بين معدل النمو فى القوارير وقوة النمو وبعض الصفات المحصولية للنباتات فى الحقل. وتشير هذه الدراسة إلى إمكانية الاعتماد على صفات النمو فى القوارير فى انتخاب الهجن التى تمتاز بقوة الهجين hetrosis. لكن على العكس من ذلك فعلى الرغم من النمو الجيد للكالس ونباتات الجيل الأول لهجين البيتونيا لم تسجل علاقة ثابتة بين النمو فى الحقل والقوارير. تمتاز بعض أنواع الكافور مثل *Eucalyptus grandis* و*E. urophylla* و *E. camaldulensis* بسهول الإكثار باستعمال العقل الغضة أو بالإكثار الدقيق على العكس من بعض الأنواع المنتشرة فى المنطقة المعتدلة مثل *Eucalyptus globulus* و *E. nitens*. وقد سجل وجود علاقة بين اختلاف الطرز المظهرى للنباتات والذى يشير إلى وجود تباين وراثى وقدرتها على تكوين جذور والذى تراوح بين صفر و ١٠٠% فى القوارير (Willyams *et al.*, 1992) وقد أشار إلى التحكم الوراثى فى الإكثار الدقيق لهجين *E. nitens* x *globulus*. ولدراسة صفة توريث تكوين الجذور فى القوارير لأشجار *E. globules* قام بدراسة تكوين الجذور لـ ٢٠ عشيرة مفتوحة التلقيح و ١٥ عشيرة منتخبة وقد تم تكرار اختبار التجذير فى سنتين. وتشر النتائج إلى التأثير العالى للجينات المضيفة فى نجاح التجزير.

وتلعب العوامل الوراثية دورهام فى هذه الاستجابات من خلال تفاعلها مع الظروف البيئية المختلفة. فعلى سبيل المثال قد يظهر صنفاً ما استجابة معينة كتكشف أشطاء عند زراعته فى تركيز معين من منظمات النمو أما الصنف الآخر فلا يظهر نفس الاستجابة إلا إذا كان نامياً فى تركيز مختلف أو باستخدام نوع آخر من منظمات النمو. فيمكن زراعة بعض أصناف القمح بنجاح فى عدة أنواع من البيئات لكن هناك

بعض الأصناف لا يمكن زراعتها تحت نفس الظروف. ولوحظ أيضاً فى البرسيم الحجازى أن بعض الأصناف ذات قدرة عالية على إنتاج الأجنة الجسدية بالمقارنة ببعض الأصناف الأخرى بصرف النظر عن البيئة المستعملة (Gahan & George, 2008). ونفس التأثير ينطبق على كل العوامل البيئة الأخرى، فعلى سبيل المثال قام Tewary *et al.* (2000) بمقارنة نسبة تفتح البراعم الجانبية ونمو الأشطاء المتكونة لأربعة طرز وراثية مختلفة من التوت البرى فى بيئة MS ذات رقم هيدروجينى يتراوح بين ٥.٨ و ١٠. ويوضح جدول رقم (٤-٢) أن جميع الطرز الوراثية لنباتات Mulberry فشلت فى النمو فى بيئة ذات الرقم الهيدروجينى ١٠ وكانت استجابة الطرز الوراثية المختلفة متباينة ومعنوية للاختلاف فى الرقم الهيدروجينى فى الصفتين المدروستين. وبالإضافة إلى ذلك كان هناك تداخل معنوى بين تأثير التركيب الوراثى والرقم الهيدروجينى على هاتين الصفتين.

ويتضح دور التركيب الوراثى للنباتات فى زراعة الأنسجة أثناء مراحلها المختلفة، ففى مرحلة تأسيس المزرعة وجد أن معدل نجاح واستمرار حيوية الأنسجة المنزرعة متباين بين الأصناف. فقد اختلفت قدرة القمم النامية على التكشف عقب الزراعة باختلاف الأشجار المأخوذة منها على الرغم من إنها من نفس الصنف ونامية تحت نفس ظروف النمو. كذلك فإن معدل تكوين الكالس وقوامه ولونه والصفات الأخرى المتعلقة به تتأثر بالتركيب الوراثى للنبات الأم. كذلك تتأثر مرحلة تكشف الأعضاء بالطريقة المباشرة من الأنسجة بالتركيب الوراثى فالنباتات التى لها القدرة على تكوين براعم عرضية على أوراقها مثل *Pepromia* و *Begonia* لها قدرة عالية على تكوين أشطاء على أنسجتها المنزرعة معملياً فى وسط مناسب مقارنة بالأنواع الأخرى. وعموماً النباتات وحيدة الفلقة لها قدرة منخفضة على التكشف المباشر بالمقارنة مع النباتات ثنائية الفلقة، كذلك تعتبر النباتات التابعة للعائلة البقولية أقل قدرة على التكشف. لكن النباتات وحيدة الفلقة والتى تكون أوراق مخزنة للغذاء ذات قدرة

أعلى نسبياً على تكوين أشطاء، والنباتات المكونة لأبصال غالباً تعطى أشطاء عند زراعة الأجزاء القاعدية لأوراقها العصارية.

جدول ٤-٢: تأثير التركيب الوراثى والرقم الهيدروجينى للبيئة على تفتح براعم ونمو أشطاء نبات Mulberry المنزرعة فى بيئةMS كما أوضحها Tewary *et al.* (2000).

الرقم الهيدروجيني	التركيب الوراثي							
	G2		G3		G4		S34	
	% للتفتح	طول الأشطاء (سم)	% للتفتح	طول الأشطاء (سم)	% للتفتح	طول الأشطاء (سم)	% للتفتح	طول الأشطاء (سم)
٥.٨	٨٥.٦	٣.٨	٧٥.٦	٣.٧	٧٠.٦	٤.٣	٧٨.٠	٦.٦
٨.٥	٧٦.٦	١.٥	٥٠.٣	٠.٦	٣٨.٨	٢.٨	٧٣.٣	٣.٠
٩.٠	٦٦.٦	١.٣	٣٥.٠	٠.٤	٣٠.٣	١.٩	٦١.١	٢.٠
٩.٥	٤٠.٣	٠.٧	٣٠.٣	٠.٢	١٥.٣	١.٥	٣٦.٠	١.٧
١٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠

يعتمد التكشف غير المباشر على وجود الكالس، وتتباين سرعة نمو وتكوين الكالس وقدرته على التكشف بين الأنواع المختلفة. لكن لا توجد علاقة ثابتة بين معدل تكوين ونمو الكالس والقدرة على التكشف. وبالتالى قد تكون نفس الجينات المسئولة عن هذه الصفات واقعة تحت تأثير جينات مستقلة. وقد أمكن تحديد العديد من الجينات المسئولة عن الاستجابات المختلفة فى الأنسجة المنزرعة معملياً. وفى بعض الحالات وجد أن هناك ارتباطاً بين سرعة النمو فى زراعة الأنسجة والصفات المحصولية والنمو فى الحقل، مما يساعد فى تصميم برامج الانتخاب المبكر لهذه النباتات.

ثانياً: العوامل المتعلقة بالنبات الأم

تتعدد صور تأثير النبات الأم على الأنسجة المنزرعة معملياً ويمكن توضيح ذلك فيما يلى:

١. مرحلة النمو والتطور

يمر النبات بمرحلتين محددتين فى تطوره عقب تكوين الزيجوت وحتى الوصول إلى مرحلة البلوغ وهو ما يعرف بـ ontogeny أوontogenesis. وتسمى المرحلة الأولى التى تكون عقب الإنبات بطور الصبا أو juvenile stage، أما المرحلة التالية وهى مرحلة النضج والقدرة على التكاثر الجنسى فتسمى بمرحلة البلوغmaturity stage. ومن الصعب إيجاد طريقة لدفع النبات إلى الأزهار فى مرحلة الصبا وقبل الوصول إلى مرحلة البلوغ . ويتم التعبير عن أى من الطورين بعدد من الجينات ذات التعبير الثابت فى الخلايا الميرستيمية فى القمم النامية. وبانقسام تلك الخلايا ينتقل هذا التعبير إلى الخلايا الجديدة وبالتالى عبر التكاثر الخضرى حيث يمكن الاحتفاظ بهذا التعبير لمدة طويلة أو قصيرة على أساس الظروف البيئة. ولكل مرحلة من مراحل النمو صفات ظاهرية أو وظيفية تميزها عن الأخرى، وقد تكون الفروق بين المرحلتين واضحة أو متداخلة. ففى طور البادرة تكون هناك صفات ظاهرية أو وظيفية تختلف تماماً عن تلك الموجودة فى النبات البالغ، لكن قد يكون من الصعب تحديد النقطة الانتقالية بين الطورين، فقد يحدث تغيير تدريجى فى بعض أو كل هذه الصفات بدخول النبات مرحلة البلوغ.

هذا وتختلف مدة كل طور باختلاف الأنواع النباتية، ففى الأشجار يستمر طور الصبا فترة طويلة تصل إلى عدة سنوات أما فى العشبيات فإن مدة هذا الطور تكون أقصر بكثير، والنباتات ذات الحولين بالطبع لها طور صبا أطول من الحوليات. كذلك تتباين الصفات الظاهرية المحددة لكل طور باختلاف الأنواع النباتية وتتضمن تغيير فى

شكل الورقة وتركيبها، لون الأوراق، نوع الكيوتيكل، وجود الأشواك، زاوية نمو الأفرع، طول السلاميات وغيرها من الصفات المختلفة باختلاف الأنواع. وأغلب النباتات فى مرحلة الصبا لها قدرة عالية على تكوين جذور على العقل علاوة على قلة إفراز المواد الفينولية، ويجب أن تؤخذ تلك الاعتبارات فى الحسبان أثناء الإكثار الدقيق. وقد تؤدى زراعة الأنسجة إلى تحول النباتات من طور الصبا إلى طور البلوغ، ويفسر ذلك فى المخروطيات بقلة المجموع الجذرى المتكون فى النباتات الناتجة معملياً عن تلك الناتجة من البذور. وهناك بعض المعاملات تُتبع لدفع النبات إلى التحول مرة أخرى إلى طور الصبا. ولما كانت النباتات التى فى مرحلة الصبا ذات صفات مفضلة للإكثار الدقيق ومحددة لنجاح زراعة الأنسجة من حيث قدرتها على تكوين الجذور، الأشطاء وكذلك الأجنة الجسدية (George, 1993).

لكن ليس من الضرورى كما تشير الكثير من الأبحاث أن تقل القدرة على التكشف عموماً وتكشف الجذور بالتحديد فى مزارع الأنسجة وباستعمال وسط نمو محدد بوصول النباتات مرحلة البلوغ. وغالباً يتم ذلك باستعمال بيئات غنية فى السيتوكينينات التى من شأنها تحفيز عودة الخلايا إلى طور الصبا. وهذا ما وصل إليه Monteuuisin (2004) فقد قام بزراعة العقل الساقية من أشجار *Acacia mangium* فى طورى البلوغ والصبا لمدة ثلاث سنوات بهدف تنشيط نمو البراعم العرضية. وبالرغم من المعدل الأعلى لتكوين الجذور والأشطاء للمُستأصَلات فى طور الصبا (٥.٥ فرع/مُستأصَل) ونسبة تجذير ٩٠% فى مقابل ٣.٩ فرع/مُستأصَل ونسبة تجذير ٧٧% للمُستأصَلات المأخوذة من أمهات فى طور البلوغ، فإنه الفرق لم يكن معنويا. لكن كان تأثير الظلام وتركيز الأملاح بالبيئة أهمية فى التجذير حتى فى حالة استخدام أمهات فى طور الصبا. وربما يرجع ذلك إلى اختلافات فى أيض المركبات المختلفة باختلاف طور النمو. ويضيف (Ballester *et al.*, 1999) أن السبب فى نقص القدرة على التجذير فى مرحلة البلوغ إنما يرجع إلى تغير فى التركيب التشريحى. وفى

دراسة لأشجار *Castanea sati* يبلغ عمرها ٨٠ سنة تبين عدم وجود اختلاف جوهرى فى القطاع العرضى للسيقان المأخوذة من التاج أو من الأفرع التى نمت فى قاعدة الجذع وهى تصنف على أنها فى طور الصبا. وأمكن دفع الخلايا فى كلا النوعين إلى الانقسام بعد فترة وجيزة من المعاملة بالأوكسينات إلا أن تكوين المبادئ الميرستيمية للجذور تم فى السيقان الأحدث بعد ثلاثة أيام من المعاملة وتكون الجذر بالفعل بعدد عشرة أيام. لكن رغم انقسام الكامبيوم فى الأنسجة البالغة لم تتكون المبادئ الميرستيمية للجذور وذلك على الرغم من ارتفاع محتوى تلك الأنسجة من IAA وكذلك المركبات عديدة الأمين. ومن العوامل التى تستخدم فى مزارع الأنسجة حتى تستعيد النباتات مرحلة الصبا (rejuvenation)

أ. **الاستطالة الإظلامية:** من المعروف أن الإضاءة المنخفضة أو الظلام يؤديان إلى استطالة الأفرع وشحوب لونها Etiolation، وتكون الأوراق المتكونة صغيرة الحجم وغير كاملة الانبساط. وتستعمل هذه الظاهرة فى زراعة الأنسجة للتخلص من بعض المسببات المرضية، وقد تكون الاستطالة ضرورية لسهولة تقسيم الساق إلى عدد من العقد لاستخدامها فى الإكثار. وتعمل هذه الظاهرة على تحول القمم الميرستيمية من النباتات المأخوذة فى طور البلوغ إلى طور الصبا. وفى دراسة لإكثار المانجو فى القوارير وجد Krishna *et al.* (2008) أن عمر نباتات المانجو الأم يلعب دور هام فى الاستجابة لزراعة القوارير. واختلف معدل بقاء الأنسجة حية عقب الزراعة على أساس الحالة الفسيولوجية والتى ترتبط بدورها بالتطور فى عمر النبات وبالرغم من اعتبار كلا المصدرين صغير العمر إلا أن النباتات التى نمت فى البيت المحمى كانت تبدو من النظرة الفسيولوجية ومحتوى النباتات فى المركبات الثانوية أصغر من تلك فى الحقل المفتوح وبالتالى كانت استجابتها أفضل. حيث فشلت المُستأصَلات التى كان مصدرها الحقل فى النمو عقب الزراعة. وقد أضاف أن تلقيح النباتات فى الحقل بفطريات mycorrhiza يحسن من استجابتها فى

زراعة الأنسجة باعتبار أن تلك الفطريات تلعب دوراً فى زيادة تحمل النباتات للإجهاد ومنه زراعة الأنسجة، إلا أن ذلك يحتاج إلى مزيد من الأبحاث. وقد قام بمقارنة محتوى المُستأصَلات النباتية للنبات النامية بالحقل من المواد الفينولية وتأثيرها على استجابتها فى القوارير وكيفية التغلب على ذلك باستخدام الاستطالة الإظلامية حيث تم تغطية السيقان الحديثة سريعة النمو بأكياس سوداء اللون لمدة أسبوع قبل استعمالها للزراعة، أو معاملة النسيج بإضافة مضادات الأكسدة. وكان لمنع الضوء عن المُستأصَلات النباتية تأثير واضح فى خفض محتواها من المواد الفينولية نتيجة نقص الإنزيمات المسئولة عن ذلك وبالتالى تقليل موت الأنسجة عقب الزراعة.

ولتوضيح أثر الإظلام على مراحل زراعة الأنسجة المختلفة قام Karam &Al-Majathoub (2000) بتنمية أبصال *Cyclamen persicum* فى بيئة رطبة فى الظلام أو تحت إضاءة للحصول على أعناق الأوراق واستعمالها للإكثار الدقيق. وأشارت النتائج إلى انخفاض معنوى فى نسبة التلوث الداخلى بالكائنات الدقيقة عند استعمال الأجزاء المستطيلة إظلامياً. وأضاف أيضاً أن نسبة الأجزاء المكونة للأشطاء كانت ٣٢% ومتوسط عدد الأشطاء ٨٦. ٠لكل مُستأصَل نباتى مقابل ٧% وكان متوسط عدد الأشطاء ١٦. ٠لكل مُستأصَل نباتى مأخوذ من النباتات النامية فى الضوء. أما الأشطاء النامية فى الظلام فكان وزن وحجم الكالس المتكون منها بعد ٨ أسابيع هو ٠.٣ جم (١.٤٠سم^{٣}) مقابل ٠.٠٢ جم،(٠.٠٣سم^{٣}) للأشطاء النامية فى الضوء على التوالى. وكذلك تبين وجود تداخل بين ظروف الإظلام والمعاملة بمنظم النمو TDZ، ولعل هذا يرجع إلى انخفاض مستوى IAA الداخلى نتيجة الظلام.

ب. **التقليم:** تجدر الإشارة إلى أن التقليم الجائر للأشجار يحفز تكوين أفرع جديدة على الجذع وفى قاعدة الساق وتتسم هذه الأفرع بعلامات طور الصبا. وقد تمكن

Rathore *et al.* (2005) من الإكثار الدقيق لأشجار *Citrus limon* المسنة بعد تقليم الأفرع فى الخريف واستعملت الأفرخ حديثة النمو فى الشتاء كمصدر للعقد الساقية للزراعة فى القوارير وتمكنت الأشطاء المتكشفة من تكوين الجذور. ولعل السبب يرجع إلى حدوث تغيير فى نسبة منظمات النمو والمركبات الأخرى فى الأفرع حديثة النمو عقب التقليم.

ج. **التطعيم:** من الثابت ارتباط ضعف تكوين الجذور على العقل بدخول النبات فى طور البلوغ ويمكن بتطعيم البراعم أو العقل الساقية المُستأصلة من الأشجار البالغة على بادرات حديثة النمو استرداد تلك العقل القدرة على تكوين الجذور طبقا لما هو معروف من تأثير الأصل على الطعم. ويعتبر النجاح فى هذا من التطبيقات العملية لزراعة الأنسجة فالكثير من الأشجار غير نقية التركيب الوراثى ولا تثمر أو تتضح قيمتها الاقتصادية إلا بعد فترة قد تصل إلى سنوات وعندها تكون فقدت القدرة على التكاثر الخضرى. وعلى الرغم من نجاح Chabukswar *et al.* (2006) فى دفع المُستأصَلات النباتية لأشجار *Garcinia indica* عمرها ٢٠ عام من تكوين براعم عرضية واستطالة تلك الأفرع إلا أنه كان من الصعب دفع تلك الأشطاء إلى التجذير. وللتغلب على ذلك قام بتطعيم عقل ساقية من الأشجار البالغة على بادرات حديثة الإنبات وقد لاحظ تكوين الكالس فى منطقة التحام الأصل مع الطعم مما يشير إلى نجاح التطعيم. وبعد شهرين تقريباً قام بفصل البرعم الطرفى وأعاد تطعيمه على بادرات جدية وبتكرار ذلك خمس مرات أصبح بمقدرة العقل تكوين الجذور. تمكن Revilla *et al.* (1996a & b) من استرداد طور الصبا المتمثل فى مقدرة العقل على تكوين مجموع جذرى ونمو البراعم الجانبية لصنف الزيتون Arbequina. بتطعيم العقل الطرفية بطول ١سم مأخوذة من أمهات مسنة على أفرع فى طور الصبا تم الحصول عليها من إنبات الأجنة فى المعمل ثم إكثار الأفرع الناتجة بالعقل الساقية. وبالمثل استردت أفرع أشجار *Sequoia sempervirens*

طور الصبا من حيث قوة النمو وتكوين الجذور على العقل عند تطعيم عقل طرفية بطول ١.٥ سم على سيقان حديثة النمو فى القوارير وتكرار التطعيم أربع مرات. وكانت قوة نمو النباتات الناتجة تعادل أو تزيد النباتات النامية من البذور وقد صاحب ذلك تغير فى بروتين الأوراق (Huang *et al*., 1992) .

د. **منظمات النمو**: إن معاملة النباتات البالغة بمنظمات النمو وخاصة السيتوكينينات عن طريق الحقن أو الرش يؤدى إلى الارتداد جزئياً أو كلياً إلى طور الصبا وامتد تأثير هذه المعاملة إلى عدد الأفرع المتكشفة (George, 1993). وتزيد فاعلية هذه الطريقة عندما يتم تطبيقها مع معاملات الظلام. وقد استردت المُستأصَلات المأخوذة من أشجار *Frazinus angustifolia* البالغة طور الصبا عندما وضع -Perez Parron *et al* .(1994) العقل الساقية فى ماء مقطر مضاف إليه ٤.٤ مليمول من BA و ٥.٤ مليمول من NAA و ١٤.٤ مليمول من GA_3. وبالفعل تم تأكيد دور الهرمونات وخاصة السيتوكينينات فى مراحل التطور للأشجار وكانت النسبة بين zeatin-type (Z-type)و isopentenyladenine-type ²(iP-type) فى أشجار *Pinus radiata* ذات أهمية فى تحول الأشجار لطور البلوغ وذلك بتقدير محتوى العقل الطرفية من نباتات بالغة ومحتوى نفس العقل بعد تطعيمها على نباتات فى مرحلة الصبا، وقد سجل انخفاض فى محتوى السيتوكينينات بدخول الأشجار مرحلة البلوغ (Valdés *et al*., 2003).

هـ. **الحرارة العالية**: تعمل الحرارة العالية عن المعدل الطبيعى على تشجيع تكوين أفرع ذات صفات الصبا من النباتات البالغة وقد أورد Preece (2008) عدة أمثلة ناجحة لذلك لكن دون تفسير واضح لفعل الحرارة.

ويتضح مما سبق تأثير طور النمو على مزارع الأنسجة فى مرحلتى التأسيس والنمو التكشف. وتعد الأنسجة الميرستيمية كنسيج الكامبيوم من الأنسجة التى يمكن

استعمالها لإنتاج مزارع ذات قدرة عالية على التكشف من الأشجار المسنة، أما تأسيس المزرعة باستعمال القمم الساقية للأشجار المسنة فهى عملية صعبة وغير ناجحة فى معظم الحالات. ومن الصعوبات التى تحول دون استخدام الأنسجة البالغة هو إفرازها لمواد فينولية والتى تسبب تسمم للنسيج وتغير لون البيئة إلى اللون الأسود أو البنى، أما الأفرع فى طور الصبا يقل إفرازها لهذه المواد. وفضلاً عن صعوبة استعمال الأنسجة المسنة كمصدر للزراعة فأن معدل نموها وتكشفها يكون منخفض. أما أنسجة الزيجوت والأجزاء المأخوذة من البادرات الحديثة الإنبات فلها قدرة عالية على التكشف والتجذير وتكوين الكالس.

٢. تأثير الجنس

من المتوقع أن يكون هناك تأثير للجنس على زراعة النباتات فى القوارير لارتباط ذلك بالمحتوى الهرمونى للنبات والأحماض الأمينية والبروتينات والعديد من نواتج الأيض (Prakash *et al.*, 2003). ومن ثم أشار Llorente & Apostolo (1998) إلى التباين فى تأثير منظمات النمو فى الإكثار الدقيق على أساس جنس أشجار *Simmondsia chinensis* وقد تبين بالفعل التباين فى القدرة على التكشف بين النباتات المذكرة والمؤنثة فى بعض النباتات أحادية الجنس. لكن لم يلاحظ Welander & Negash (2005) فرق بين الأشجار المذكرة والمؤنثة *Hagenia abyssinica* ونظراً لصعوبة التفريق بين النباتات المذكرة والمؤنثة فى العديد من النباتات فإن تحديد طريقة مثلى لإكثار النباتات المؤنثة ستساهم بلا شك فى إنتاج نباتات ذات فائدة اقتصادية. ولدراسة تأثير جنس النبات المستخدم على تكشف الأشطاء من البراعم الجانبية لخمسة طرز وراثية من نبات الهوهوبا، قام Tyagi & Prakash (2004) بزراعة عقد الساقية من نباتات مذكرة وأخرى مؤنثة فى بيئة MS محتوية على تركيزات مختلفة من BA. وتشير النتائج المبينة فى جدول رقم (٤-٣) إلى اختلاف استجابة الطرز الوراثية، كما

تباين عدد الأشطاء المتكشفة من كل جزء نباتى على حسب جنس النبات الأم، وكان أعلى عدد للأشطاء وهو ١٠ لكل جزء نباتى عند زراعة أجزاء من النباتات المذكرة للطراز الوراثى EC 99692 فى بيئة محتوية على ١٠ ملجم لكل لتر من BA و ٩.٣ لكل جزء نباتى عند زراعة أجزاء من النباتات المؤنثة للطرز الوراثى EC 171284. وأوضحت الدراسة أيضاً إلى أن المحتوى العالى من السيتوكينينات فى النباتات المذكرة قد يكون هو سبب استجابتها العالية بالمقارنة مع النباتات المؤنثة مع الأخذ فى الاعتبار الفروق بين الطرز الوراثية المختلفة.

جدول ٤-٣: تأثير جنس النبات والتركيب الوراثى و BA على تكشف الأشطاء من العقد الساقية لنبات الهوهوبا (Tyagi & Prakash, 2004).

التركيب الوراثي	BA (ملجم/لتر)							
	٠	٢	٥	١٠	٠	٢	٥	١٠
	النباتات المذكرة				النباتات المؤنثة			
EC99690	٢.٣	١.٨	٥.٦	٥.٠	٢.٠	٢.٧	٤.٦	٣.٤
EC99691	١.٧	٤.٦	٥.٥	٣.٠	٢.٤	٣.٤	٥.٠	٨.٧
EC99692	٢.٢	٤.٧	٣.٧	٧.٤	٣.٠	٤.٧	٥.٣	١٠.٠
EC171284	١.٦	٦.١	٦.٠	٩.٣	٢.٥	٢.٠	٣.٧	٧.٠
EC267779	٢.٥	٦.٣	٤.٢	٤.٦	٢.٠	٥.٢	٨.٢	٦.٥

لكن فى معظم الحالات تستجيب النباتات المؤنثة بصورة أفضل من المذكرة. وعلى الرغم من العديد من الدراسات التى اهتمت بدراسة إكثار أشجار الهوهوبا المذكرة والمؤنثة فهناك تعارض فى إمكانية تحديد بعض المؤشرات للتفريق بين جنس النبات فى المراحل الأولى من النمو فى مزارع الأنسجة. ويبين Prakasha *et al.*

(2003) وجود تباين فى استجابة العقد الساقية من كلا الجنسين للنمو والتفريع فى القوارير باختلاف الأملاح المعدنية فى البيئة، وحتى لتركيز الفحم المنشط وPVP الذى استخدم للتغلب على المواد الفينولية. وقد خلصت الدراسة إلى إمكانية استعمال وسط MS المضاف إليها ٥% من لبن جوز الهند أو ٠,٠٠٥، ٠.٠٢٥، ٠.٠٥، ٠.٠٧٥، ٠.١ مليمول من PVP لتحديد جنس النباتات فى السلالة ٣٣١٩٨ من الهوهوبا. وفى استعراضه للدراسات الأخرى فى هذا الصدد أشار إلى وجود اختلاف فى محتوى الأوراق والأزهار من الفينولات على العكس من إنزيم البيروكسيديز والبروتين الكلى. أما الكالس المتكون من نباتات *Actinidia deliciosa* المذكرة فقد احتوى على ضعف تركيز الإنزيم السابق بالمقارنة مع كالس النباتات المؤنثة.

٣. معاملة النبات الأم والأجزاء المفصولة قبل التعقيم

تتوقف التطورات التى تحدث للنسيج عقب الزراعة على الحالة الفسيولوجية للنسيج والتى بدون شك ترتبط بالمعاملات التى تتم للنباتات مصدر المُستأصَل النباتى، وكذلك الظروف البيئية المحيطة. وفى معظم التجارب كان أحسن جزء نباتى هو المأخوذ من نباتات خالية من الأمراض والإصابات الحشرية. وأى نباتات مصابة بمرض يجب التخلص منها إلا إذا كانت هناك ضرورة قصوى لذلك. لأن هذا النسيج يموت غالباً وإن نجحت زراعته فهناك نسبة عالية من احتمال انتقال المرض إلى النباتات الناتجة والتى يكون عددها قليل وحجمها أصغر مقارنة مع تلك المتكشفة من الأنسجة السليمة، ويتوقف ذلك على نوع المسبب المرضى والعائل. وفى حالة حدوث تلوث داخلى لابد من إتباع الطرق الموصى بها للتغلب عليه كالمعاملة بالمضادات الحيوية أو المطهرات السطحية. وسيتم توضيح ذلك بالتفصيل عند الحديث عن تأسيس المزرعة فى الفصل التالى. وبصورة عامة لا يفضل استعمال النباتات النامية فى الحقل المفتوح لأنها أكثر عرضة للتلوث، علاوة على صعوبة التحكم فى العوامل المختلفة

التى تؤثر فى النمو. ومن الناحية التطبيقية فإن النباتات العشبية يمكن تنميتها فى ظروف متحكم فيها على العكس من الأشجار. وإن كان من الضرورى الاعتماد على الأشجار المسنة لكونها نادرة مثلاً أو ذات طرز وراثية مفضلة فتؤخذ العقل وتزرع للحصول على أفرع حديثة تستخدم براعمها الجانبية للإكثار الدقيق. ويعاب على هذه الطريقة طول المدة التى تمر من أخذ العقل حتى إمكانية الحصول على البراعم الجانبية وتقدر هذه المدة فى بعض هجن الكافور بـ ٨-١٢ شهر.

ولما كانت معظم الأشجار تنمو فى مناطق بعيدة عن معامل الإكثار الدقيق فإن الأجزاء المفصولة قد يصيبها الذبول. كما تزيد نسبة حدوث التلوث الداخلى خلال الـ ٧٢ ساعة التالية للفصل وقبل تعقيم وزراعة الأجزاء المفصولة. وقد قام Watt *et al.* (2003) بمقارنة نقل الأجزاء المنتخبة للزراعة وهى عبارة عن عقل بها برعم واحد أو ثلاث براعم من أشجار *Eucalyptus grandis* النامية فى البيت المحمى بعد معاملتها ببعض المضادات الفطرية إلى المعمل. وقد تم تغليف العقل فى البولى إثيلين أو زرعت فى زجاجات زراعة محتوية على ٣-٤جم فيرموكيوليت معقم ومبلل بالماء. وكانت نسبة التلوث مرتفعة تصل إلى ٥٠-٥٧% عند لف الأجزاء النباتية فى البولى إثيلين مقارنة بالطريقة الأخرى. كذلك كانت نسبة تفتح البراعم فى حال استعمال زجاجات الزراعة ٥١-٥٥% على حسب طول العقلة مقابل ٢٠-٣٤% فى حالة استعمال البولى إثيلين. وفى نفس الدراسة قام الباحث بفصل أفرع تحتوى على برعم طرفى وبطول حوالى ١٠٠مم. ثم قسمت الأفرع لنوعين من العقل الأول طولها ٢٠-٣٥ مم عبارة عن برعم واحد فى إبط ورقة تم إزالة نصفها العلوى. أما النوع الثانى فكان عقل طولها ٣٥-٥٠ مم بها ثلاث براعم وتم إزالة جميع الأوراق من عليها. ورشت الأجزاء المفصولة بالماء المقطر المعقم أو بالكحول ٧٠% وحفظت فى زجاجات الزراعة أو فى البولى إثيلين لمدة ٤٨ ساعة على درجة حرارة ٢٤-٢٦°م فى الظلام. وأعقب ذلك إجراء التعقيم السطحى والزراعة فى بيئة الإكثار. وتوضح النتائج المدونة فى جدول

رقم (٤-٤) أثر المعاملات السابقة على تلوث المزرعة فى مراحل نموها المختلفة وتفتح البراعم وعدد الأشطاء المتكونة. وتشير النتائج إلى انخفاض معنوى فى نسبة التلوث وزيادة عدد الأشطاء المتكشفة من الجزء النباتى برش الأجزاء المفصولة بالكحول ونقلها إلى المعمل فى أوعية محتوية على فيرموكيوليت معقم.

وهناك كثير من الأبحاث التى تشير إلى تأثير معاملة النبات المصدر ببعض المعاملات لتشجيع التكشف، فمثلا سجلت زيادة فى عدد الأشطاء المتكشفة عند معاملة نباتات الفاصوليا التى استعملت كمصدر للأجزاء النباتية أثناء مرحلة إنبات البذور بمنظمات النمو BA وCPPU و TDZ . وأشار البعض إلى دور السيتوكينينات فى هذه المرحلة فى حث انقسام الخلايا المؤهلة للتكشف. وكان تأثير المعاملات مقتصر على الأجزاء المكونة للبذور وليس على الأوراق التى تتكون لاحقاً.

٤. الظروف البيئية التى ينمو فيها النبات الأم

يتم التحكم فى النمو بعديد من العوامل الداخلية التى ترتبط بدون شك بالعوامل الخارجية. فهناك ارتباط بين تغذية ورى النبات الأم والحالة الفسيولوجية للنسيج وبالتالى استجابة المُستأصَل النباتى، حيث تؤثر التغذية والرى فى مدى تركيز العناصر الغذائية ومنظمات النمو فى الأنسجة النباتية. وقد أدى تغيير معدل التسميد بالأسمدة المختلفة وخاصة النتروجينية إلى تغيير الاستجابة الحادثة للنسيج المنزرع. والعامل الآخر الذى يتداخل مع تغذية ورى النبات الأم هو ميعاد أخذ النسيج. فمن الطبيعى أن الإجهاد المائى ودرجات الحرارة وطول الفترة الضوئية وشدتها والطول الموجى تتغير على مدار العام وربما فى اليوم الواحد. ويؤدى هذا التغيير إلى اختلاف فى محتوى النبات الأم وأنسجتها من منشطات ومثبطات النمو والمواد الكربوهيدراتية والنتروجينية، كما يؤثر أيضاً على معدل حدوث التلوث المرضى الموجود بالنسيج. ومن هذا يتضح أن التوليفة المثلى من العوامل البيئة التى ينمو فيها النبات الأم خاصة

النامية بالحقل والتى تساعد على النمو والتكشف فى زراعة الأنسجة متباينة ومتداخلة مع بعضها ومن الصعب التحكم فيها. لذا يفضل أن تؤسس المزرعة من نباتات تنمو تحت ظروف المعمل (George, 1993).

جدول ٤-٤: تأثير نوع المُستأصَل النباتى لأشجار *Eucalyptus grandis* وبعض المعاملات قبل التعقيم على استجابته للإكثار الدقيق (Watt *et al.*, 2003).

المُستأصَل النباتى*	المعاملة**	مرحلة تفتح البراعم		مرحلة الإكثار			
		% للتلوث	% للتفتح	العدد النهائى/الأشطاء/ ١٠٠ جزء	الأشطاء/ عقدة	الأشطاء/ جزء	% للتلوث
T1	A1S1	٩٣	٥٠	٠	٠	٠	١٠٠
T1	A1S2	٠	٦٣	٦٦٢	١٠	١٠.٢	٠
T1	A2S1	٠	٤٧	٥٧٣	١٨.٢	١٨.٢	٣٣
T1	A2S2	٠	٥٠	٦٨٥	١٣.٧	١٣.٧	٠
T2	A1S1	٠	٣١	٥٣٤	٦.٢	١٩.٣	٢٧
T2	A1S2	٠	٥٥	٣٦٥	٢.٣	١٧.٢	٠
T2	A2S1	٠	١٨	١٦٤	٣.٨	١١.٤	٢٠
T2	A2S2	٦.٧	٦٧	١٦٦٢	٨.٩	٢٦.٩	٦.٧

*T1 عقلة بها برعم واحد فى إبط ورقة تم إزالة نصفها العلوى، T2 عقلة بها ثلاثة براعم وتم إزالة الأوراق من عليها،المعاملات** A1 رش الأجزاء المفصولة بالماء المقطر المعقم، A2 رش الأجزاء المفصولة بالكحول ٧٠%، S1 حفظت الأجزاء فى البولى إثيلين ، S2 حفظت الأجزاء فى فيرموكيوليت معقم ومبلل بالماء.

ولعل تأثير فصول السنة المختلفة على الاستجابة فى مزارع الأنسجة يتضح بشدة فى الأشجار النامية فى المناطق التى يتضح فيها الفرق بين فصول السنة المختلفة. ويؤكد ذلك Kartsonas & Papafotiou (2007) عند زراعة البراعم المفصولة من

بادرات حديثة الإنبات أو نباتات بالغة لأشجار *Quercus euboica* حيث شاهد اختلاف فى قدرة البراعم المفصولة فى شهور مختلفة من أمهات بالغة أو بادرات حديثة الإنبات فى البيت المحمى على تكشف الأشطاء فى القوارير (جدول رقم ٤-٥). كما بين وجود تداخل بين العمر وميعاد أخذ المُستأصَلات، بينما لم يكن هناك تأثير لتوقيت أخذ المُستأصَلات أو عمر الإنبات الأم على عدد الأشطاء المتكشفة. وتشير كثير من الأبحاث إلى أن الأجزاء المأخوذة عند بداية موسم النمو أو أثناء موسم النمو غالباً ما تكون ذات قدرة أعلى على النمو من تلك المأخوذة فى نهاية موسم النمو. لكن استنتج Lardet *et al.* (1998) أن هناك قدرة عالية لبراعم أشجار *Hevea brasiliensis* و *Theobroma cacao* التى تم الحصول عليها أثناء طور السكون على التفتح والنمو بالمقارنة مع البراعم التى تم جمعها أثناء طور نمو الأوراق أو الساق. وقد أمتد نفس التأثير عند إعادة تقسيم الساق وزراعته حيث كان عدد البراعم والأشطاء المتكشفة أعلى عند استعمال البراعم التى فى طور السكون كمُستأصَل نباتى لتأسيس المزرعة. وربما يرجع ذلك إلى التغير الكبير فى محتوى النبات من السكريات والمركبات الأخرى المصاحبة لبدء النمو عقب السكون.

ثالثاً: العوامل المتعلقة بالمُستأصَل النباتى

بفرض ثبات باقى العوامل المتعلقة بالنبات الأم والظروف البيئة فإن هناك الكثير من العوامل المتعلقة بالمُستأصَل النباتى نفسه والتى تؤثر على استجابته فى زراعة الأنسجة وهذه العوامل هى:

١. عمر المُستأصَل النباتى

يقاس عمر المُستأصَل النباتى بعمر العضو النباتى المأخوذ منه هذا الجزء أو عمر النبات الأم، وذلك اعتباراً من تكوين الزيجوت أو تفتح البرعم المكون للنبات. والمقياس الآخر للعمر، هو العمر الفسيولوجى للعضو وهو ما سبق الإشارة إليه عند الحديث عن مرحلة النمو. وأصغر الأجزاء النباتية عمراً هى الأنسجة الغير متكشفة أى

جدول ٤-٥: تأثير عمر النبات الأم وميعاد أخذ المُستأصَلات النباتية من أشجار *Quercus euboica* على التكشف فى القوارير (Kartsonas & Papafotiou, 2007).

ميعاد الزراعة	عمر الأم	% للمُستأصَلات التى تكشفت	عدد الأشطاء/ مُستأصَل	متوسط طول الأشطاء
مايو	بادرة	٧٧	١.٣	٢.٧
	أشجار بالغة	٦٩	١.٠	٢.٠
يونيو	بادرة	٦٥	١.١	٣.٧
	أشجار بالغة	٣٤	١.٠	٢.٧
سبتمبر	بادرة	٢٨	١.١	٢.٨
	أشجار بالغة	٢٤	١.٠	٣.٠

الأنسجة الميرستيمية، أما الخلايا المتكشفة الناتجة منها فهى أكبر عمراً. ونظرياً فإن الأنسجة الميرستيمية يمكن أن تظل على هذه الحالة أى فى مرحلة الصبا إلى ما لانهاية لو تم فصل القمم النامية وزراعتها ودفعها إلى تكوين الجذور باستمرار فى المعمل. وفى دراسة لتأثير عمر المُستأصَل النباتى على التكشف فصلت منطقة epicotyl وهى تلك الواقعة أعلى الأوراق الفلقية وأسفل الأوراق الحقيقية من بادرات *Vigna mungo* عمرها يتراوح بين ٣ و ١٧ يوم. ويبين (Saini *et al.*, 2002) أن الأشطاء قد تكونت من كلا طرفى المُستأصَل النباتى عندما أخذ من بادرات عمرها ثلاثة أيام. وتكشف عدد أكبر الأشطاء فى القاعدة المنغمسة فى بيئة النمو بالمقارنة مع العدد المتكشف من القمة. لكن تكشفت الأشطاء على الطرف العلوى فقط للمُستأصَلات الأخرى، ومع هذا لم يكن هناك فرق معنوى فى عدد الأشطاء الكلى بصرف النظر عن عمر المُستأصَل كما هو

مبين فى جدول رقم (٤-٦). كما تأثر عدد الأشطاء المتكشف بعدد أخر من العوامل الخاصة بالمُستأصَل النباتى ستناقش لاحقاً.

وبعد تكوين المزرعة يمكن استخدام النباتات أو الأنسجة الناتجة كمصدر جديد لمزرعة جديدة أو ما يسمى بـ subculture. ويؤثر عمر المزرعة قبل استعمالها كمصدر للمزرعة الجديدة على استجابتها فقد استخدم Quraishi *et al.* (2004) مُستأصَلات من تاج أشجار *Azadirachta indica*، أو من البراعم القاعدية المتفتحة حديثة النمو على قاعدة الأشجار، وكذلك من بادرات حديثة الإنبات. وقد لاحظ فرق فى قدرة هذه المُستأصَلات على النمو إنتاج الأشطاء. وكان من الضرورى استعمال PVP للتغلب على المواد الفينولية فى حالة استعمال مُستأصَلات من أشجار بالغة وعلى الرغم من ذلك ماتت المُستأصَلات التى جمعت من التاج بعد تجديد زراعتها للمرة الثالثة فى حين تكونت جذور على المُستأصَلات الأخرى. وغالباً للأنسجة المأخوذة من نباتات صغيرة العمر أو أعضاء حديثة التكوين قدرة أعلى على النمو والتكشف فى زراعة الأنسجة سواء بالطريقة المباشرة أو غير المباشرة (George, 1993). وقد تظهر كالسات العديد من الأنواع النباتية قدرة أعلى على النمو والتكشف لمدة طويلة تحت ظروف معينة لكنها تفقد هذه القدرة بعد فترة من زراعتها فى القوارير. ويرجع ذلك إلى أسباب مازالت قيد البحث وغير معروفة تماماً إلا أن هناك عدة نظريات لتفسير ذلك وهى:

أ. **التباين الوراثى**: عادة يتم انتخاب الخلايا ذات القدرة على النمو فى المزرعة لكن قد لا يتفق هذا مع القدرة على التكشف. ولذا قد يؤدى انتخاب الخلايا ذات القدرة العالية على النمو إلى فقدان الخلايا ذات القدرة على التكشف.

جدول ٤-٦: تأثير عمر المُستأصَل النباتى على تكشف الأشطاء فى نباتات *Vigna mungo* كما وجدها Saini *et al.* (2002).

عمر البادرة (يوم)	% المُستأصَلات التى كونت أشطاء	% المُستأصَلات التى كونت أشطاء فى كلا الطرفين	متوسط عدد الأشطاء/مُستأصَل		متوسط طول الأشطاء
			القمة	القاعدة	
٣	٣٣.٣	١٦.٦	١.٧	٣.٠	١.٨
٨	٤٤.٤	٠	٣.٦	٠	٣.٣
١٢	٥٦٦.٦	٠	٣.٦	٠	٢.٩
١٧	٧٧.٥	٠	٣.٦	٠	٢.٠

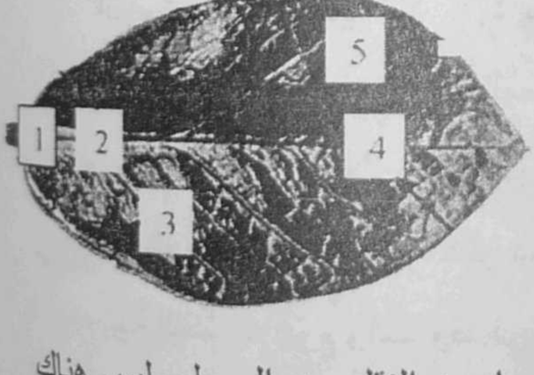
ب. وجود مواد مشجعة على التكشف: قد تحتوى الأنسجة حديثة الزراعة على مواد مشجعه للنمو والتكشف وباستمرار زراعتها يحدث نقص فى التركيز الضرورى لذلك. أو قد تتراكم مواد مثبطه للنمو والتكشف أثناء مراحل الزراعة السابقة. وقد أكد Blanco *et al.* (1997) هذه الفرضية فى دراسة لإكثار إحدى سلالات قصب السكر عن طريق الأجنة الجسدية حيث لاحظ انخفاض فى المحتوى الكلى للبروتين فى الكالس، وارتبط ذلك بالقدرة على تكشف النباتات. فبعد ستة أشهر من الزراعة تم فيها إعادة الزراعة تسع مرات فقد الكالس القدرة على التكشف حيث أنخفض البروتين الكلى من ٤.٧-٥.١ ملجم/جرام طازج من الكالس إلى أقل من ٠.١ ملجم على أساس نوع الأوكسين المستعمل. ويشير التحليل الكهربى للبروتين المستخلص من الكالس إلى وجود بروتين محدد تراوح وزنه على أساس نوع الأوكسين المستعمل بين ٥٥ و٦٧ كيلو دالتون. وسجل وجود هذا البروتين بعد نقل الكالس إلى بيئة التكشف بيوم واحد وقد ارتبط وجود هذا البروتين بالقدرة على التكشف.

ج. التغيرات الوراثية: رغم احتفاظ الخلية بمعلوماتها الوراثية الضرورية للتكشف إلا أنه من الضرورى المحافظة على آلية العمل المنظم لهذه المنظومة والتى قد يحدث

لها فقد باستمرار الإكثار أو تصبح غير فعالة نتيجة حدوث تغيرات وراثية ترجع إلى الظروف البيئة وهو ما يعرف بالتغيرات الوراثية الجسدية سواء الوراثية أو فوق الوراثية (أنظرالفصل السابع). وباستخدام الوراثة الجزيئية يبين (Hao & Deng, 2002) أن كالسات البرتقال تفقد قدرتها على تكوين الأجنة الجسدية بعد عدة مرات من تكرار زراعتها نتيجة لبعض العوامل الوراثية وفوق الوراثية. ويمكن للكالس استعادة تلك القدرة عند تعرضه لبعض صور الإجهاد البيئة مثل الحرارة المنخفضة أو التجفيف. ولارتباط مجاميع الميثل بالحامض النووى دور كبير فى هذه الظاهرة. لكن درس Zhang *et al.* (2006) معدل التضاعف الكروموسومى فى العديد من أصناف الحمضيات أثناء زراعتها فى القوارير ولم يجد ارتباط بين معدل التضاعف الحادث وقدرة الخلايا على التكشف أو طول مدة الزراعة. لكن فقد ٢٦ طرز وراثى من بين ٣٥ طرز تم دراستها القدرة على تكوين الأجنة الجسدية بطول فترة الزراعة.

٢. موقع وحجم المُستأصَل النباتى

تتباين قدرة الأنسجة المختلفة المأخوذة من نفس العضو النباتى على النمو والتكشف فى زراعة الأنسجة وتعرف هذه الظاهرة باسم Topophysis. وهذا المصطلح مشتق من الكلمة اللاتينية *Topos* والتى تعنى المكان وكلمة *Physis* والتى تعنى طبيعة Nature. وتختلف استجابة الأجزاء المأخوذة لمنظمات النمو ومكونات البيئة الأخرى على أساس مكان وجودها فى العضو



المأخوذة منه وربما يتعدى هذا التأثير إلى مرحلة ما بعد النقل من المعمل. ليس هناك تفسير دقيق لهذه الظاهرة (George, 1993). قام Papafotiou & Martini (2009) بزراعة مُستأصَلات ورقية من خمسة مناطق لأوراق *Zamioculcas zamiifolia* كما

فى الشكل المبين فى عدة أوساط نمو. وفى البداية لم يشاهد اختلاف بين تلك المُستأصَلات إلا أنه بعد الأسبوع الثالث بدأت الأجنة الجسدية فى التكشف من المُستأصَل الأول والثانى وبمعدل عالى. وكان أعلى معدل لتكوين الأجنة للمُستأصَل المفصول من الموقع الأول عند إضافة 2,4-D فقط للبيئة أما المُستأصَل المفصول من الموقع الثانى فكانت أفضل استجابة له عند إضافة BA إلى البيئة. أما المُستأصَلات التى فصلت من قمة الورقة والتى لم تتضمن جزء من العرق الوسطى فكانت استجابتها منخفضة جداً. وترجع بعض التفسيرات تأثير مكان المُستأصَل إلى دور بعض منظمات النمو مثل الأوكسينات والسيتوكينينات وربما حامض الأبسيسك لكن يعتقد أن الدور الكبير يرجع إلى السيتوكينينات، حيث أشار Papafotiou & Martini (2009) إلى تحسن فى استجابة المُستأصَلات البعيدة عن العرق الوسطى بإضافة السيتوكينين للبيئة.

وفى دراسة قام بها Bredmose *et al.* (1999) لتوضيح أثر هذه الظاهرة فى إكثار بعض هجن الورد باستعمال البراعم الجانبية، تم أخذ عقل ساقية كل منها يتكون من برعم واحد فى إبط ورقة مكونة من خمس وريقات على الأقل، بحيث تم أخذ تسع عقل من نفس الساق وبترتيب من ١ إلى ٩ متجها من القمة إلى القاعدة. ولاحظ أن أغلب العقل الثلاثة القاعدية لم تتكشف براعمها أو تكشفت لكنها لم تنتج أزهار لإجهاض البرعم الزهرى فى مراحل تكونه الأولى. وكان أيضاً لموضع العقل تأثيراً فى بعض الصفات فقد زادت المدة اللازمة من الزراعة حتى بدء نمو البرعم وكذلك الفترة السابقة لتكوين البرعم الزهرى وطول الحامل الزهرى بالاتجاه إلى أسفل، لكن لم يكن هناك فرق فى قطر الأزهار ولا عمرها بعد القطف. وتختلف استجابة الأجزاء المختلفة المنزرعة من الجزء النباتى لمكونات البيئة والظروف البيئية للزراعة، ففى تجربة أخرى لدراسة تأثير عدة توليفات من منظمات النمو على التكشف العرضى لبراعم نبات التيوليب وذلك بزراعة أجزاء مأخوذة من مواضع مختلفة من الحامل الزهرى، أوضح Wright (1980) كما هو مبين فى شكل رقم (٤-٣) أن عدد الأشطاء المتكشفة

تتأثر بموضع المُستأصَل النباتى ونوع وتركيز منظمات النمو المستعملة بالإضافة إلى التداخل بينهما.

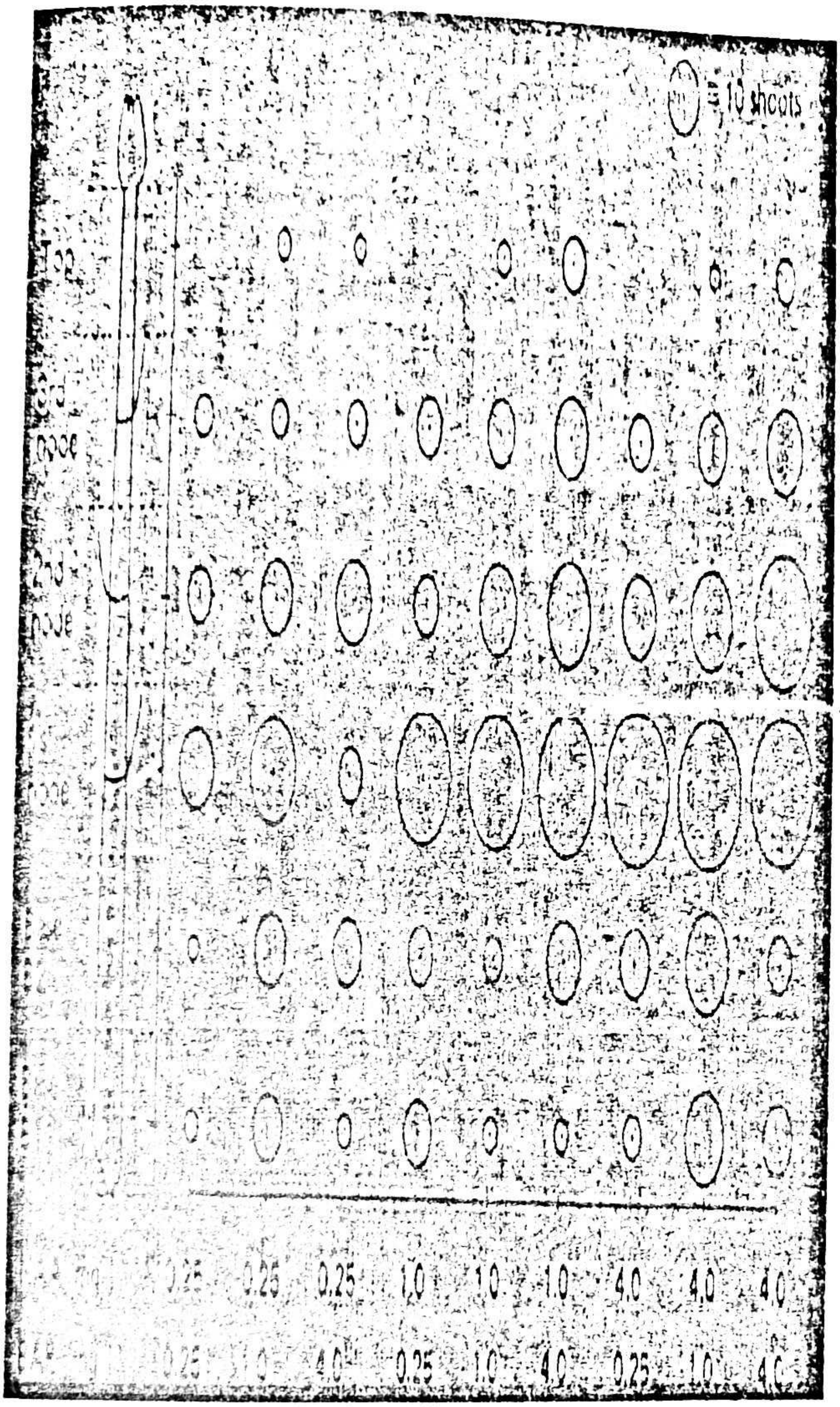
هناك غالباً حجماً مثل للمُستأصَل النباتى المناسب للزراعة، فالأجزاء الصغيرة جدا سواء أكانت نسيج أو قمة ميرستيمية أو كالس تموت عند زراعتها. أما الأجزاء الكبيرة نسبياً فتكون صعبة التعقيم وكذلك يكون السطح المقطوع أقل نسبياً وبالتالى يقل امتصاص مكونات البيئة، ويؤثر حجم المُستأصَل النباتى على نسبة السطح الملامس للبيئة. لكن يجب أن يؤخذ فى الاعتبار أن الزيادة النسبية فى امتصاص مكونات البيئة لا تعنى زيادة معدل النمو والتكشف. فعند تقسيم الجزء الطرفى من ساق نبات *Lilium longiflorum* إلى أجزاء بسمك يتراوح بين ٠.٥ إلى ٣ مم وزراعتها فى بيئة تحتوى على نصف تركيز مكونات بيئة MS مع الاحتفاظ بنفس الاتجاه المورفولوجى للأجزاء المنزرعة. أوضحت النتائج أن الأجزاء ذات السمك ٠.٥ مم كانت حيويتها منخفضة (٥%) أما الأجزاء ذات السمك الأكبرفكانت نسبة بقائها حية أعلى وتتراوح بين ٨٠-١٠٠%، لكن لم تتكون أشطاء فى كل الحالات. وبإضافة الفحم المنشط بمعدل ١ جم/لتر تحسنت نسبة بقاء الأنسجة الحية وتكونت أشطاء وكان أعلى معدل لتكوين الأشطاء ٤.١/جزء نباتى عندما استعملت أجزاء ذات سمك ١ مم (كانت مدة الزراعة ٤٥ يوم). وعندما قسمت الساق إلى أجزاء سمكها ١مم كانت نسبة حيوية الأجزاء العلوية منها (١-٥) مرتفعة وتصل إلى ١٠٠% وانخفضت هذه النسبة إلى ٨٥، ٧٠% على التوالى للجزئيين التاليين. كما انخفض معدل تكوين الأشطاء من ٨.٥/ جزء نباتى إلى فرع واحد فقط لكل جزء نباتى بعد ٦٠ يوم من الزراعة (Nhut *et al.*, 2001). وفى معلق الخلايا يلاحظ أن هناك حد أدنى من الكثافة الخلوية الضرورية لنمو الخلايا.

٣. طريقة زراعة المُستأصَل النباتى

وهى تعنى اتجاه وضع المُستأصَل النباتى فى البيئة شبه الصلبة أو البيئة السائلة الثابتة، أما البيئة السائلة المتحركة فلا يمكن المحافظة على اتجاه محدد للمُستأصَل. فالأجزاء المأخوذة من الأوراق مثلا إما أن توضع على سطح البيئة بحيث يكون السطح السفلى أى القاعدة الظاهرية ملامس للبيئة أو توضع بطريقة عكسية. وكذلك بالنسبة للأجزاء المفصولة من السيقان فقد توضع بحيث يكون الجزء القريب من القمة النامية أى القمة الظاهرية متجهاً إلى أعلى أو العكس، أما القمة الظاهرية للجذور فهى الجزء القريب من القمة النامية. ومن المعروف من دراسات علم وظائف النبات أن هناك فرق جهد بين القمة الظاهرية والقاعدة الظاهرية النسيج النباتى. ويرجع ذلك لتأثير وجود أيون الهيدروجين حيث يعمل الأوكسين والبوتاسيوم على حركه أيون الهيدروجين إلى الطرف العلوى من الخلية وبذلك تصبح الخلية ذات شحنة موجبة فى الطرف العلوى وشحنة سالبة فى الطرف السفلى،أما الخلية الموضوعة أفقياً فهي ذات شحنة موجبة فى الناحية العليا وسالبة فى الناحية السفلى. ويبين شكل رقم (٤-٤) مدى تأثير زراعة العقل الساقية للقرنفل المحتوية على برعم واحد على التكشف العرضى للأشطاء، كما يلاحظ تكوين الكالس على الطرف السفلى للمُستأصَل عند زراعته مقلوباً.

لكن يوضح Garcı´a-Luis *et al.* (2006) عدم وجود دور للجاذبية الأرضية المتعلق بطريقة توجيه المُستأصَل على مسلك التكشف لمُستأصَل بادرات نبات *Troyer citrange* وهو أحد الأصول المستعملة لإكثار الحمضيات. وقد تأثر معدل تكوين الكالس وعدد الأفرع المتكشفة على القطبية و طرف المُستأصَل ملامس للبيئة. فبزراعة المُستأصَل أفقيا تكون الكالس على كلا الطرفين لكنه كان أكبر عند القاعدة، ورغم انه لم يسجل فرق فى عدد البراعم على كلا الطرفين فإن عدد أكبر من

موقع المُستأصل النباتى



تركيز منظمات النمو فى بيئة MS

شكل ٤-٣: يوضح تأثير التداخل بين مصدر المُستأصَل النباتى ومنظمات النمو على عدد الأشطاء الناتجة لكل جزء نباتى مأخوذ من ساق زهرية طولها ٢٢ مم لنباتات لصنف Merry widow من التيوليب (Wright, 1980).



شكل ٤-٤: العقل الساقية للقرنفل منزرعة فى وضع مقلوب (يمين) ووضع طبيعى (يسار).

الأشطاء تكون على القمة. لكن عند زراعة المُستأصَل عمودياً تكون الكالس على الطرف الملاصق للبيئة بصرف النظر عن نوعه، وتكشفت الأشطاء مباشرة من القمة إن لم تكن ملامسة للبيئة فإن كانت هى المنغمسة فى البيئة تكون الكالس قبل تكشف الأشطاء. وقد أضاف أن تكوين الكالس ارتبط بتركيز السيتوكينين لكن على العكس من ذلك لم يكن تكشف الأشطاء على القمة غير الملامسة للبيئة بسبب السيتوكينينات . وذلك لأنه لم يمكن استحثاث تكشف الأشطاء على قاعدة المُستأصَل البعيدة عن البيئة والمنزرع فى وضع مقلوب بالمعاملة الموضعية بنفس التركيز من السيتوكينينات الذى أضيف للبيئة لاستحثاث تكوين الأشطاء. وتكشف الأشطاء بطريقة غير مباشرة على القاعدة الملامسة للبيئة وبزراعة المُستأصَل مقلوب حتى لا تلامس القاعدة البيئة وقف التكشف، ويبين ذلك دور القطبية وملامسة المُستأصَل للبيئة.

عادة يُظهر المُستأصَل النباتى نوعاً من القطبية أثناء النمو والتكشف، ويرتبط ذلك بطريقة وضع النسيج فى المزرعة واتجاه وضع الأوعية المحتوية على المزرعة .وفى معظم الحالات يتم تكوين الأشطاء من القمة الظاهرية للجزءالمنزرع سواء السيقان أوالجذور أما الجذور فتتكشف من القاعدة الظاهريةأى الجزء الأقرب للجذور

من المُستأصَلا لنباتى ويطلق عليها proximal. وقد درس(2006) *Newell et al.* تكشف الجذور على عقل نباتات *Lens culinaris* حيث زرع العقل رأسياً فى البيئة فى الوضع الطبيعى أو المقلوب، وقارن ذلك بوضع أنابيب الزراعة المحتوية على الآجار فى وضع مقلوب بعد الزراعة كما فى جدول رقم (٤-٧). ولمعرفة تأثير التهوية قام بزراعة العقل فى الوضع الطبيعة أو المقلوب فى بيئة استبدل فيها الآجار بخليط من البيت موس والبيرليت والرمل الخشن.

ويتضح من الجدول أن الجذور تكشفت على قاعدة العقل حتى تلك التى زرعت مقلوبة. لكن كان لتأثير التهوية دور مهم حيث كان معدل تكشف الجذور أعلى على القاعدة الموجودة بعيداً عن البيئة أو تلك التى زرعت فى تربة تضمن التهوية بصرف النظر عن اتجاه العقلة.

جدول ٤-٧: تأثير اتجاه الزراعة والتهوية على تجذير عقل *Lens culinaris* كما لاحظها(2006) Newell *et al.*.

	اتجاه العقل ووسط الزراعة					
اتجاه العقل وبيئة الزراعة	⇧	⇩	⇧	⇩	⇧	⇩
	آجار		آجار		مخلوط تربة	
وضع الأوعية	طبيعى		مقلوبة		طبيعى	
معدل تكوين الجذور	١.٥	٦٢.٥	١٠٠	٢٥.٠٠	٩٦.٩	٨٤.٤
متوسط عدد الجذور	١.٠	١.٨	٢.٠	١.٣	٢.٧	٢.٤
متوسط الطول (سم)	٧.٠	٧.٧	٩.٣	٦.٧	٥.٤	١٠.٩

وتتكون الأشطاء غالباً على السطح العلوى أو الجزء البعيد من عنق الورقة عند زراعة الأجزاء الورقية أما الجذور فتتكون على السطح السفلى أو الجزء القريب من الساق. وبتقسيم العضو الواحد إلى عدة أجزاء متساوية فإن بعض الأجزاء بصرف النظر عن موضع النسيج فى ذلك العضو يكون لها قدرة أعلى على النمو والتكشف

دون غيرها على أساس الشحنة الموجودة على النسيج. وتؤثر منظمات النمو المختلفة خاصة IAA على اتجاه القطبية فى المُستأصَل النباتى بسبب حركتها القطبية من أعلى إلى أسفل. وربما تكون القطبية غير واضحة فى حالة الأنسجة صغيرة الحجم لكنها تزيد بزيادة حجم النسيج.

وكما أن لاتجاه وضع المُستأصَلا لنباتى تأثير على القطبية فإن وضعه فوق أو داخل البيئة له تأثير على النمو والتكشف. وقد يعزى ذلك إلى القدر المتاح من مكونات البيئة ومنظمات النمو كما أشار Papafotiou & Martini (2009) فى دراسته على نباتات *Z. zamiifolia* حيث يبين أن وضع المُستأصَلات عمودياً يقلل من تكوى الأجنة الجسدية بالمقارنة مع الزراعة الأفقية. وقد درس Orlikowska *et al.* (2000) تأثير وجود الأوراق والقمة النامية للأفرع أو إزالتها من الجزء المستعمل للزراعة فى نباتات الكروتون *Codiaeum variegatum* مع وضع المُستأصَلا لنباتى فى نفس اتجاه النمو الطبيعى أو أفقيا أو وضعه مقلوباً بحيث تكون القمة النامية إلى أسفل. لكن هذا الاتجاه الأخير لم يُتمكن من المحافظة عليه طول فترة التجربة، حيث أدى تكوين الأوراق إلى خلل فى هذا الوضع وجعل المُستأصَل النباتى يأخذ وضعا أفقيا بعد فترة من الزراعة. وتوضح النتائج بجدول رقم (٤-٨) تأثير هذه المعاملات على معدل التكشف للأشطاء وطول الأشطاء المتكشفة،ويتضح أن إزالة الأوراق والقمة النامية ووضع النسيج أفقيا أعطت أفضل النتائج.

٤. التنافس بين الميرستيمات المتكونة فى المُستأصَل النباتى

يؤدى ارتداد بعض خلايا المُستأصَل النباتى إلى الحالة الميرستيمية عقب الزراعة إلى تثبيط تحول الخلايا الأخرى للحالة الميرستيمية. وتزيد هذه القدرة بزيادة حجم النسيج الميرستيمى، حيث ترسل خلايا هذا النسيج إشارات يعتقد أنها عبارة عن اكسينات إلى الخلايا الأخرى لتثبط ذاك التحول. وبالتالى يلاحظ أن البراعم العرضية الحديثة تعمل

جدول ٤-٨: تأثير إزالة الأوراق والقمة النامية واتجاه وضع النسيج لنبات *Codiaeum variegatum* على نمو البراعم الجانبية (Orlikowska *et al.*, 2000).

صفة المُستأصَل النباتى	عدد الأشطاء المتكونة	عدد الأشطاء الأطول من ١سم
عدم إزالة الأوراق والوضع رأسيا	١.٥	٠.٥
عدم إزالة الأوراق والوضع رأسيا مع إزالة القمة النامية	٢.٤	١.٣
إزالة الأوراق والوضع رأسيا	٣.٩	١.٩
إزالة الأوراق والوضع رأسيا مع إزالة القمة النامية	٣.٥	١.٠
إزالة الأوراق والوضع أفقيا	٥.١	٠.٥
إزالة الأوراق والوضع رأسى مقلوب	٤.٧	٠.٤

على تثبيط تكوين أخرى جديدة، ومن ثم يجب إزالة الأشطاء المتكونة لدفع المُستأصَل النباتى إلى تكوين أشطاء جديدة وكذلك الحال للأجنة الجسدية Preece (2008). وقد استدل ببعض الملاحظات على نبات *Picea abies* فبالرغم من تكشف ١٠-٣٠ برعم عند زراعة الأجنة فإن ثلاثة أشطاء فقط استطالت إن لم يتم فصل الأشطاء التى وصل طولها إلى ٣-٥ مم تقريباً وبذلك استطالت باقى البراعم تباعا، وبالمثل لم تستطيل أشطاء *Pinus radiata* إن لم يتم تقسيم المناطق الميرستيمية وإبعادها عن بعضها البعض. وتختلف شدة هذه الظاهرة باختلاف الأنواع النباتية ومدى التداخل بين العوامل الوراثية ومكونات البيئة وخاصة منظمات النمو.

٥. الجروح

فى الظروف الطبيعة تؤدى عمليات التقليم، والرعى الجائر، والضرر الميكانيكى إلى تشجيع نمو الكالس على الأنسجة المقطوعة أو تشجيع نمو البراعم

الساكنة وكذلك تكوين براعم عرضية فى بعض النباتات. وبالطبع أثناء زراعة الأنسجة يتعرض المُستأصَلا لنباتى إلى عدة صور من التجريح وكلما كان المُستأصَل النباتى صغير كلت مساحة السطح المقطوع منسوباً للسطح الكلى كبيرة وبالتالى يزيد أثر التجريح. وقد يعزى التغيير الحادث فى المُستأصَلا لنباتى بعد ذلك إلى المواد المخلقة منه كغاز الإثيلين. هذا وقد سبق مناقشة التأثير الفسيولوجى للتجريح على الأنسجة المنزرعة باستفاضة فى الفصل الخاص بمنظمات النمو. إلا أنه قد يكون من المفيد الإشارة إلى دراسة Zeng *et al.* (2009) على أشجار *Citrus reticulate* حيث قام بزراعة مُستأصَلات مفصولة من البادرات بعد شقها طولياً أو بدون شقها. وقد وصلت نسبة المُستأصَلات التى تكشفت إلى ١٠٠% وبمعدل ١٣.٢ برعم للمُستأصَل الواحد فى مقابل ٦٥% وبمعدل ٦.٧ عند عدم شق المُستأصَلات. وفى كلا الحالتين تم التكشف بطريقة مباشرة أو غير مباشرة من الكامبيوم الحزمى. ومن ثم يتبين أن إحداث الجروح فى الكامبيوم استحث الخلايا للتكشف. ويعتقد أن هذه الطريقة قد تكون بمثابة حل لتكشف الأشطاء فى النباتات التى يصعب زراعتها فى القوارير. ولعل إحداث تجريح للمُستأصَل النباتى هو من مستلزمات التحول الوراثى عند استخدام *Agrobacterium* كوسيط لنقل الجينات.

رابعاً: العوامل المتعلقة بالظروف البيئية للمزرعة

يقصد بالظروف البيئية فى هذا الصدد الظروف التى يتم فيها تحضين المُستأصَل النباتى والمزرعة الناتجة منه. فعلى الرغم من وجود المزرعة فى وعاء مقفل يعزل البيئة الداخلية إلى حد ما عن الخارجية، فإن التحكم فى البيئة الخارجية يحور مكونات الداخلية. وفى حالة تكشف نباتات فإن الأجزاء الخضرية منها والموجودة فوق سطح البيئة تكون أكثر تأثراً بالبيئة الخارجية عن الجذور والتى تتأثر بدرجة عالية بالبيئة الداخلية أى الوسط المغذى. ومن ثم فإن التحكم فى البيئة الخارجية

يكون له تأثير مباشر وسريع على الأجزاء الخضرية أما التأثير على المجموع الجذري فيكون بطئ وغير مباشر فى معظم الحالات. ويتوقف مدى تأثر الظروف الداخلية بالظروف الخارجية على درجة التبادل الغازى بينهما. وهناك العديد من المقالات المرجعية حول هذا الموضوع منها (2007) Mehrotra *et al*. و Kozai *et al*. (1997) ويمكن حصر الظروف البينية التى تؤثر فى زراعة الأنسجة فى العوامل التالية:

١. طبيعة البيئة

تستعمل البيئة المغذية فى صورة سائلة أو فى صورة شبة صلبة كما هو متبع فى العديد من مزارع الأنسجة. وأحد أسباب تأثير طبيعة البيئة على زراعة الأنسجة هو وجود ذلك الغشاء الرقيق من الماء الذى يحيط بالمُستأصَل النباتى ويلتصق به وهو ما يسمى بـ Nearest layer والذى قد يكون عقبة فى طريق انتشار المواد المختلفة من وإلى المُستأصَلا لنباتى. ويعتمد سمك هذا الغلاف على طبيعة البيئة، ففى البيئة شبة الصلبة يكون سميكاً بالمقارنة مع الحالة السائلة، ويقل هذا السمك أيضاً اعتماداً على قوة رج البيئة. وعلى الرغم من ذلك فإن استعمال البيئة شبة الصلبة سائد فى مزارع الأنسجة لأنه يحقق المميزات التالية:

أ .إمكانية رؤية الأجزاء الصغيرة والتعامل معها.

ب .احتفاظ المُستأصَل النباتى باتجاه ثابت أثناء الزراعة وبالتالى نمو الأفرع المتكشفة باتجاه طبيعى عكس الوسط السائل المتحرك حيث تفشل الأفرع فى النمو الطبيعى.

ج. عدم الحاجة إلى وسيلة للتهوية التى قد تكون صعبة التنفيذ أو مرتفعة التكاليف.

أما عيوب استعمال البيئات الصلبة والتى تعتبر من مميزات استعمال الوسط السائل فهى:

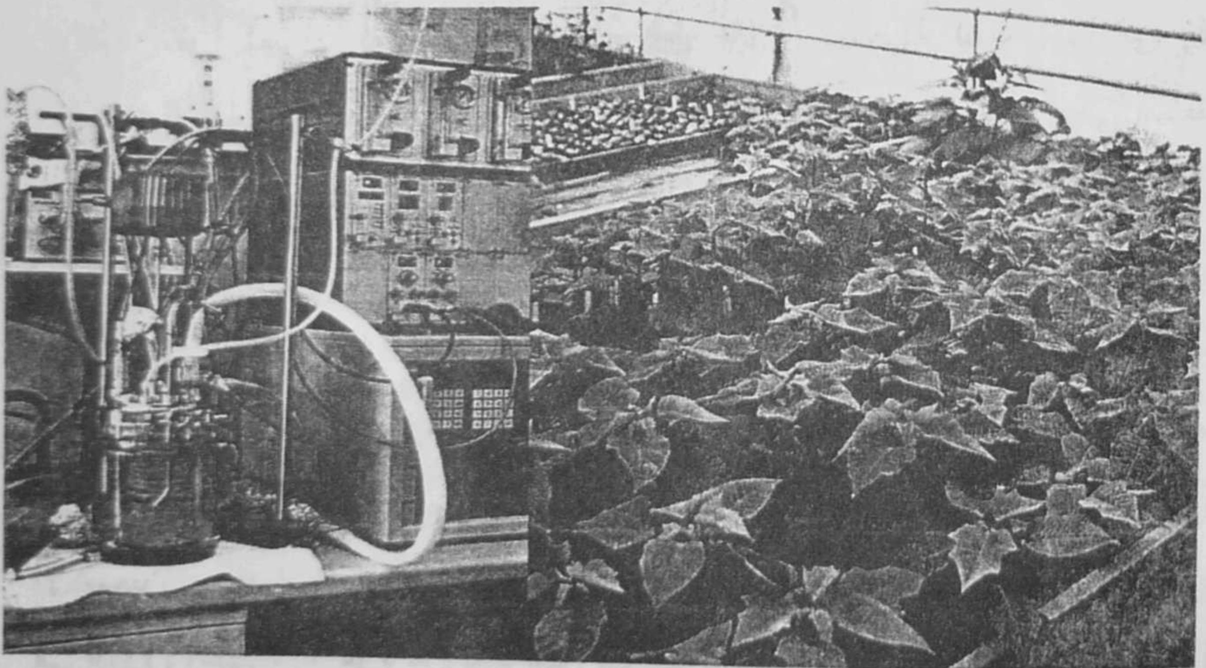
أ. ضرورة تقسيم أو نقل المزرعة كل فترة تتراوح بين ٤ و ٦ أسابيع مما يزيد من تكاليف الإنتاج حيث أن ذلك يتطلب عمالة تقدر بنحو ٤٠-٦٠% من تكاليف الإنتاج.
ب. المواد السامة المفروزة من المُستأصَل النباتى لا تنتشر بسرعة إلى البيئة وبالتالى تتراكم فى النسيج.
ج. التصاق الأجار بجذور النبيتات الناتجة يمثل عقبة فى عمليات الأقلمة والزراعة خارج المعمل لذا يجب التخلص منه وقد يضر ذلك بالجذور المتكونة.
د. صعوبة استعمال الآجار فى الأنظمة الميكانيكية فإنه قد يحتوى على مواد مثبطة للنمو أو التكشف أو على الأقل تؤثر على سرعة التكشف.
هـ. صعوبة إزالة البيئة من الأوعية المستخدمة للزراعة والتى يستعمل عدداً كبيراً منها فيؤدى ذلك إلى زيادة التكاليف.

ويمكن فى بداية تأسيس المزرعة أى فى المرحلة الأولى استعمال بيئة شبة صلبة ثم تنقل المزرعة فى المرحلة الثانية من الإكثار إلى بيئة سائلة للعمل على زيادة تكوين البراعم العرضية ثم تنقل بعدها إلى بيئة صلبة فى المرحلة الثالثة لتشجيع تكوين الجذور على الأشطاء. لكن تتوقف إمكانية إتباع هذا الأسلوب على النوع النباتى. وقد استعمل Riek *et al.* (1997) نظام آخر لإكثار الورد يعرف بالبيئة ذات الطورين double phase culture حيث يتم وضع المُستأصَل النباتى على سطح البيئة الصلبة ويضاف بعد ذلك البيئة السائلة على السطح فتعمل البيئة الصلبة على تثبيت المُستأصَل النباتى وتقوم البيئة السائلة بتغذيته. وبذلك يمكن إحداث تغيير فى محتويات البيئة بأن تضاف مثلاً منظمات نمو لتشجع التجذير بدلاً من نقل الأشطاء إلى أوعية جديدة محتوية على بيئة جديدة. وللحد من التكاليف إنتاج النباتات باستخدام الوسط شبة الصلب تستعمل البيئات السائلة فقط أو كلا الوسطين فى نفس المزرعة ويكثر استعمال المزارع السائلة فى المعلق الخلوى والأجنة الجسدية ومزارع الجذور على العكس من الإكثار الدقيق وإنتاج النباتات بالرغم من أن التصاق كل المزرعة بالوسط المغذى سوف يشجع امتصاص المزيد من مركبات البيئة وبالتالى تحفيز النمو Mehrotra *et al.* (2007) .

ويعمل استمرار حركة المزرعة على الحد من تأثير السيادة القمية وبالتالى إنتاج المزيد من البراعم التى ربما تنفصل عن بعضها تلقائياً نظراً للحركة الميكانيكية للمزرعة وبالتالى يقل التنافس بين الميرستيمات الذى ذكر آنفاً. وتشجع هذه العوامل على استخدام الميكنة فى العديد من مراحل زراعة الأنسجة. وسجل .Piatczaka *et al* (2005) زيادة مقدارها ثلاثة أضعاف فى عدد اشطأ *Centaurium erythraea* عند استعمال البيئة السائلة بالمقارنة مع البيئة شبة الصلبة. وصاحب ذلك زيادة فى الوزن الكلى الرطب والجاف للأشطاء لكن انخفض وزن الأشطاء الفردية كذلك كانت الأوراق صغيرة ونحيلة. وبالطبع يتوقع أن تكون مشكلة التميز المائى من المشكلات الأساسية التى تعيق استعمال البيئات السائلة إلا أن ذلك يرتبط بالنوع النباتى ومستوى السيتوكينين. وأمكن تجذير الأشطاء التى تكشفت فى وسط سائل عقب نقلها إلى بيئة شبة صلبة بصرف النظر عن التميؤ الزجاجى. وبعد الأقلمة كان وزن النباتات التى تكشفت سابقاً فى بيئة سائلة أعلى من تلك التى تكشفت فى وسط شبة صلب، وربما يفسر ذلك بمخزون الأشطاء المرتفع من السكريات والمواد الأخرى.

ونظراً لحاجة الأنسجة المنزرعة المثلى من الأكسجين فإن البيئة السائلة الثابتة لا توفر حاجة النسيج من الأكسيجين. وهذا بفرض أن الأنسجة غير منزرعة فى طبقة رقيقة من البيئة مثل نظام النقطة المعلقة. وإذا كان من الضرورى استعمال البيئة السائلة ولا توجد وسيلة لجعل البيئة متحركة لضمان التهوية فتستعمل طبقة رقيقة منها بحيث يكون جزء من المُستأصَل النباتى معرضاً للهواء، أو جعل النسيج يطفو فوق السطح باستعمال بعض المواد التى تزيد كثافة البيئة مثل Ficoll. أما الطريقة الشائعة للتهوية فى المزارع السائلة فهى استعمال أجهزة رج أو تدعيم النسيج فوق ورق ترشيح. وفى مجال الإكثار التجارى وباستعمال زراعة الأجنة على وجهة الخصوص تستعمل بعض المفاعلات الحيوية Bioreactor صغيرة الحجم والموضح فى شكل رقم (٤-٥).

وفى الغالب تقتصر استعمال المفاعلات الحيوية على مرحلة تضاعف الخلايا وتكوين الأجنة الجسدية، ثم تنقل الخلايا أو الأجنة المتكونة إلى بيئة شبة صلبة لتكشف الأشطاء أو النباتات. ويختلف تصميم المفاعل تبعاً للهدف من استعماله مثل المزارع كبيرة الحجم كمعلق الخلايا الذى يستعمل لإنتاج المواد الفعالة معملياً أو بغرض تحويل بعض المواد الأولية إلى مواد ذات أهمية خاصة. لكن عموماً تتم التهوية عن طريق دفع تيار من الهواء المعقم إلى داخل المزرعة (Paek *et al.*, 2005). وهو نفس النظام المتبع فى زراعة الخلايا البكتيرية إلا أن هناك بعض العيوب لاستعمال البيئة السائلة بهذا النظام، نظراً للاختلافات الكبيرة بين المزارع البكتيرية والأنسجة النباتية كحساسية بعض الأنسجة لعمليات الرج والضرر الميكانيكى shear stress وتكوين فقاقيع ورغوة داخل النظام. وسيتم مناقشة ذلك فى الجزء الخاص بزراعة المعلق الخلوى.



شكل ٤-٥: إلى اليسار المفاعل الحيوى Bioreactor المستعمل لزراعة المعلق الخلوى لنباتات *Euphorbia pulcherrima* وإلى اليمين النباتات التى تم أقلمتها (Preil *et al.*, 1991).

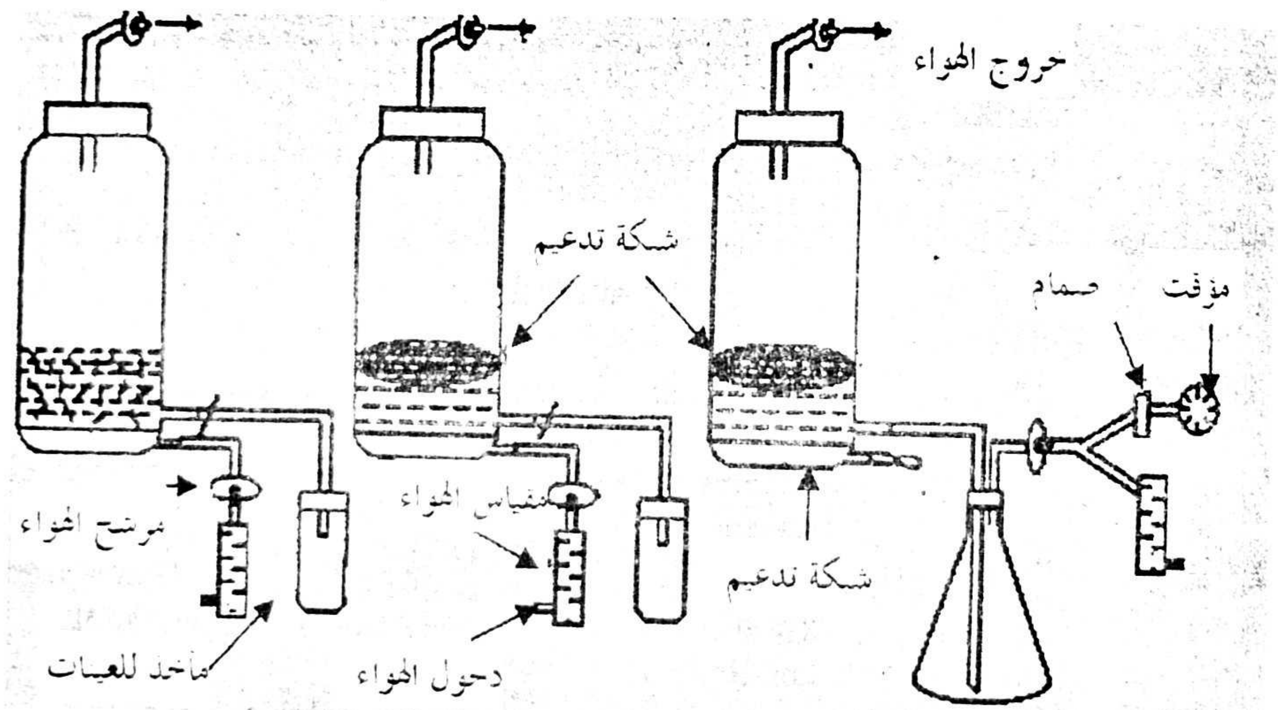
وقد نجح استعمال المفاعلات الحيوية بصورة كبيرة فى إنتاج درنات البطاطس وبصيلات Lillium والتى تزرع مباشرة فى حقول الإنتاج. وأمكن استخدام بعض

التصميمات الحديثة من المفاعلات الحيوية والتى يعتمد التقليب فيها على دفع تيار من الهواء مثل BTBB فى إكثار بعض النباتات مثل التفاح والعنب والبيجونا والأناناس وغيرها باستخدام البراعم العرضية وهو الأمر الذى لم يكن من السهل تحقيقه باستخدام التصميمات القديمة (Paek *et al.*, 2005). ونظراً لصغر حجم الأجنة الجسدية وتماثلها وعدم الحاجة إلى تقطيعها وزراعة كل جزء مستقلاً عن الأخر كما هو الحال فى مزارع الأشطاء فإنه يسهل استعمال المفاعلات الحيوية فى الإكثار التجارى للكثير من الأنواع. ولعل من المناسب هنا التعرض لمزارع الغمر المؤقت نظراً لاستخداماتها الحديثة فى الإكثار التجارى للتغلب على عيوب المفاعلات الحيوية وعدم إمكانية استخدامها فى الإكثار التجارى.

أنظمة الغمر المؤقت

نظراً لعيوب استعمال أجهزة bioreactor وصعوبة استخدامها فى إنتاج نباتات فى مزارع الأنسجة اتجه البعض إلى ابتكار نظم جديدة يعتمد على استعمال الوسط السائل مع محاولة تلافى عيوب المفاعلات الحيوية فيما يعرف بنظام الغمر المؤقت Temporary Immersion System (شكل رقم ٤-٦). وكان كلاً من Harria & Mason (1983) رواد فى هذا الاتجاه حيث تمكنا من عمل أول نظام يعتمدهذه الفكرة وسمى بالـ Tilting System وسمى الجهاز بالـ Auxophyton ويضمن تصميم الجهاز غمر الأجزاء المنزرعة فى الوسط السائل ثم تعرضها للهواء لتوفير الأكسجين. وعند استعمال هذا الجهاز لأول مرة فى زراعة أنسجة الجزر حققت زيادة فى الوزن أعلى ٢.٦ مرة من تلك التى سجلت باستعمال وسط شبه صلب. ولا تتوقف أهمية استعمال TIS على زيادة الوزن بل فى كثير من الدراسات كانت النباتات الناتجة ذات جودة عالية. فعلى سبيل المثال استخدم Yang & Yeh (2008) نظام TIS فى الإكثار الدقيق لنباتات *Calathea orbifolia* بهدف التغلب على انخفاض معدل الأقلمة. وأشار إلى تأثير نظام المزرعة على التركيب التشريحى لأوراق فزاد سمك الخلايا

الكلورنشيمية والتى تلعب دور هام فى الأقلمة فى نظام TIS بالمقارنة مع البيئة شبة الصلبة. ولم يتوقف الأمر عند ذلك بل زاد سمك طبقة الشمع على الأوراق وقل عدد الثغور على وحدة المساحة، وربما يرجع ذلك إلى زيادة معدل التهوية فى هذا النظام. وكانت قدرة النباتات من نظام TIS على الأقلمة والنمو فى البيت المحمى أفضل. لكن على العكس من ذلك اتضحت ظاهرة التميؤ الزجاجى فى حوالى نصف الأشطاء الناتجة من TISوالتى لم يتغير عددها الكلى بالمقارنة مع استعمال البيئة التقليدية (Shaik *et al*., 2009). ثم توالى ابتكار عدد من هذه الأنظمة عقب استخدام Auxophyton.وتصنيف هذه الأنظمة على أساس طريقة عملها إلي :



شكل ٤-٦: رسم تخطيطى يوضح فكرة المفاعل الحيوى المعتمد على الغمر المؤقت فى اليمين، ونظام الغمر المستديم ذو شبكة لتدعيم النمو فى الوسط وآخر بدون شبكة تدعيم فى اليسار (Piao *et al*., 2003).

Tilting & rocker machines

يعتمد على الحركة المائلة للأوعية ذات الانبعاجات الخارجية التى تشبه القوارير.

Complete immersion of plant material & renewal of the nutrient medium.

يعتمدعلى غمر كامل للأجزاء النباتية مع تجديد البيئة السائلة.

Partial immersion & a liquid nutrient renewal mechanism;

غمر جزئى للأجزاء النباتية مع تجديد البيئة السائلة.

Complete immersion by pneumatic driven transfer of liquid medium & without nutrient medium renewal

غمر كامل للأجزاء النباتية بنظام الإزاحة الغازية للبيئة السائلة غير المتجددة.

ولمزيد من المعلومات عن تركيب وكيفية عمل هذه الأنظمة وتأثيراتها على إكثار العديد من الأنواع النباتية يرجع إلى المقالات المرجعية Ziv (1999) و Etienne & Berthouly (2002) وكذلك Paek *et al.* (2005). ويلاحظ أن الاختلاف بين هذه الأنظمة يكون فى حجم الجهاز، ونوع المزرعة المستعملة فيها، ووجود الحاسوب واستعماله فى حساب مدة الغمر أو استعمال مؤقت بسيط، وجود مضخة هواء من عدمه، واستعمال البيئة مرة واحدة أو إعادة استعمالها فى دورات متتالية وانفصال خزان البيئة عن أوعية الزراعة أو دمجهما معاً. وعلى أى حال فإن هذه الأجهزة كان لها تأثيرات إيجابية على عملية الإكثار الدقيق. ومن الدراسات المرجعية التى تمت الإشارة إليها سابقاً يمكن استخلاص المميزات التالية عند مقارنة هذا النظام مع البيئات شبة الصلبة أو السائلة كما يلى:

أ. مرحلة تكشف الأشطاء: عند استعمال هذا النظام لإنتاج أشطاء في *Pinus radiata* أمكن استمرار الإنتاج لمدة ١٨ شهر باستمرار تجديد البيئة ودون الحاجة لتقسيم ونقل المزرعة كما هو الحال عند استعمال البيئة شبه الصلبة. وخلال هذه المدة أمكن فصل الأفرع المناسبة للتجذير ونقلها من الجهاز، وتميزت هذه الأفرع بزيادة عددها وطولها مقارنة مع تلك البيئة في شبة الصلبة.

ب. **تكوين الدرنات**: تحسين معدل النمو وتكوين الدرنات فى البطاطس باستعمال أحد أنظمة الغمر المؤقت بالحصول ٥٠٠-٦٩٠ درنة فى الجهاز خلال ١٠ أسابيع مقابل ٢٢٠ درنة باستعمال النظام التقليدى Jar fermentor وكان هناك أيضاً زيادة فى الوزن الكلى للدرنات وزيادة فى درجة التجانس باستعمال الغمر المؤقت. وفى المقابل لم تتكون أى درنات فى نظام الغمر المستمر. وكان معدل تكوين الدرنات هو ٣ درنات/عقلة محتوية على برعم واحد. وحقق أكثر من ٥٠% من الدرنات الناتجة وزناً أعلى من ٠.٥ جم/درنة مع تفتحت ٣-٤ عيون من كل درنة فى نفس المزرعة مكونة أفرع.

ج. **تكوين الأجنة الجسدية**: استعمل أحد أنواع هذا النظام لتكوين الأجنة الجسدية للجزر ونخيل البلح الذى يعتمد على الغمر لمدة ٥-١٠ دقائق كل ساعتين. وسجل بذلك زيادة ١.٩ مرة فى معدل تكوين الأجنة الجسدية للجزر وزيادة ٤ مرات لتكوين الأجنة الجسدية فى نخيل البلح مقارنة مع البيئة شبة الصلبة. والأكثر أهمية من زيادة معدل تكوين الأجنة هو التحسن فى نوعية الأجنة الناتجة.

د. **تطور الأجنة الجسدية**: تم إنتاج الأجنة الجسدية لـ *Citrus deliciosa* فى معلق خلوى وتتبع تطورها فى نظام الغمر المؤقت ونظام المعلق الخلوى باستعمال هزاز بسرعة ١٠٠ دورة بالدقيقة أو البيئة شبة الصلبة. فى الحالة الأخيرة وجد أن ٦٠% من الأجنة نمت وكونت أوراق فلقية لكن كان بها ظاهرة التميؤ الزجاجى أما عند استعمال نظام الرج لم تتكون الأوراق الفلقية وتوقف تطور الأجنة عند الطورالكروى globular فى حين أدى استعمال نظام الغمر المؤقت إلى تكون الأوراق الفلقية فى ٦٦% من الأجنة المنزرعة والتى كانت كبيرة الشبه بالأجنة الجسدية المتكونة من نسيج النيوسيلة. كذلك انخفض عدد الأجنة الثانوية وهى ظاهرة غير مرغوبة المتكونة على الجنين الأساسى.

العوامل التى تؤثر فى مدى استجابة المُستأصَل النباتى لنظام الغمر المؤقت

أ. زمن الغمر: فترة غمر النسيج فى الوسط المغذى هى الفترة التى يتمكن فيها النسيج من امتصاص المواد المختلفة من البيئة وكذلك غسل المواد المخرجة من النسيج والتى تكون موجودة على سطحه. وتعتبر فترة غمر النسيج من العوامل شديدة التأثير فى ظاهرة التميز الزجاجى. ويتباين زمن الغمر الأمثل ومدى تكراره حسب النوع النباتى ونوع النسيج وطور النمو والنظام المستعمل. وقد وجد أن الزمن الطويل للغمر بمعدل (يصل إلى ١-٦ساعات) فعال فى إنتاج درنات البطاطس، أما الغمر لمدة دقيقة واحدة كل ١٢ ساعة فكان هو الزمن الأمثل فى إنتاج الأجنة الجسدية فى نباتات البن العربى. أما بالنسبة لإنتاج أشطاء العنب فقد كان أفضلها هو تكرار الغمر فى البيئة لمدة ٣٠ ثانية كل ٣٠ دقيقه.

ب. حجم البيئة: إذا لم تكن البيئة متجددة كما فى بعض الأنظمة مثل نظام Twin flasks فلابد من تحديد الحجم الأمثل للبيئة. وكان الحجم الأمثل عند زراعة أنسجة *Saccharum spp* هو ٥٠٠ مل حيث زاد معدل تكوين الأشطاء من ٨.٣ لكل جزء نباتى إلى ٢٣.٩ خلال ٣٠ يوم من الزراعة. لكن لم يؤثر الحجم فى طول الأشطاء المتكونة. وكان الحجم الأكبر من البيئة أقل كفاءة فى الإكثار، وعُلل ذلك بأن المزرعة تنتج بعض المواد المشجعة للنمو، وبزيادة حجم البيئة يحدث لهذه المواد تخفيف مما يؤثر سلبياً على النمو.

ج. حجم الأوعية: سبق القول بأن حجم الوعاء من العوامل المؤثرة فى الإكثار الدقيق بوجه عام ويزيد هذا التأثير بالإضافة إلى حجم الفراغ الموجود فى الوعاء فى أنظمة الغمر المؤقت. وفى هذه الأنظمة تستعمل أوعية ذات أحجام تتراوح بين ١-٢٠ لتر. وأمكن الحصول على أشطاء أطول وأقوى نمواً فى العنب فى حالة استعمال أوعية أكبر حجماً.

د. التهوية: يعد نقص الأكسجين فى البيئة السائلة من أهم العوامل التى تؤثر سلبياً على نمو الأنسجة المنزرعة وخاصة صغيرة الحجم، ويتضح هذا فى حالة استعمال الأنظمة التى لا تجدد فيها البيئة. فلم يكن هناك تحسن فى نمو أنسجة الموز عند استعمال نظام التقليب وذلك بزراعة أنسجة صغيرة الحجم نسبياً منه. بينما أدى دفع تيار من الهواء فى البيئة إلى تحسن فى النمو، وكانت أنظمة الغمر الجزئى أفضل الأنظمة التى استخدمت فى إكثار الموز. ويلاحظ أن الأنظمة المختلفة تختلف عن بعضها من ناحية توفير الأكسجين والتهوية والرطوبة النسبية. ويعتبر أفضلها فى التهوية هو النظام الذى يضم مضخة لدفع الهواء مع دفع البيئة إلى الوعاء المحتوى على المزرعة ثم إعادة سحبه مرة أخرى.

تأثير الزراعة بنظام الغمر المؤقت على النباتات الناتجة

أ. الصفات الظاهرية: كانت مجموعات أشطاء الأناناس التى تكشفت فى بيئة سائلة باستعمال Bioreactor ذات شكل كروى غالباً وتبدو وكأنها تنمو حول نقطة مركزية. وأغلب تلك الأشطاء كان صغير الحجم وغير مناسب للتجذير والأقلمة وتطلب الأمر إجراء مرحلة خاصة للاستطالة والتجذير. أما الأشطاء الناتجة فى نظام الغمر المؤقت فكانت أطول ونموها أفضل إلا أن أوراقها كانت أصغر حجماً. تحافظ بعض أجهزة نظام الغمر المؤقت على القطبية مثلها مثل استعمال البيئات شبة الصلبة على النقيض من استعمال Bioreactor. وأشار عدد كبير من الباحثين أن هذا النظام كان أفضل من استعمال البيئة شبة الصلبة لإكثار أنواع نباتية متباينة، حيث كانت الأشطاء أطول وأثقل وزناً وربما يرجع ذلك لمعدل التهوية أو لكبر حجم الإناء مما يسمح للأشطاء بالاستطالة. وكذلك فى حالة إنتاج الأجنة الجسدية كما سبق ذكره.

ب. **ظاهرة التميؤ الزجاجي:** رغم أن الزراعة فى البيئة السائلة لها العديد من المميزات إلا أن أحد أهم عيوبها هى حدوث ظاهرة التميؤ الزجاجى. وذلك نتيجة استمرار ملامسة النسيج للبيئة وانخفاض معدل التهوية مما يؤدى إلى تغيير فى بعض الصفات الظاهرية والفسيولوجية للأنسجة. ويمكن التغلب على هذه الظاهرة فى هذا النظام بزيادة التهوية وتقليل زمن التصاق البيئة بالنسيج. وقد سبق الإشارة إلى ضرورة تحديد الزمن الأمثل لمدة الغمر وتكراره، وبالطبع تزداد هذه الظاهرة بزيادة مدة الغمر وقصر الفترة الفاصلة.

ج. **الأقلمة:** تميزت النبيتات الناتجة من هذا النظام لمعظم الأنواع التى تم دراستها كقصب السكر، الموز، البن وغيرها بقدرة عالية على الأقلمة مقارنة مع النبيتات الناتجة من استعمال البيئة السائلة أو شبة الصلبة فقد وصلت نسبة نجاح الأقلمة إلى ٩٥ : ١٠٠% فى قصب السكر وكان طول النبيتات المنقولة لا يقل عن ٦سم. وامتد هذا التأثير إلى مرحلة النمو بعد الأقلمة فى نباتات *Callistephus hortensis* حيث كانت صفات النمو المختلفة أفضل من تلك النباتات الناتجة فى بيئة شبه الصلبة.

٢. نوعية الأوعية

تتباين نوعية الأوعية المستعملة فى زراعة الأنسجة لكنها لابد وأن تفى بشرط الشفافية ليسهل رؤية المزرعة وفحصها بالإضافة لمرور الضوء. ومن ثم يمكن استعمال الزجاج أو البلاستك بأنواعه المختلفة. وعادة يفضل استعمال تلك المصنوعة من الزجاج حيث يمكن استعماله مرات عديدة مع سهولة غسيله وتعقيمه. لكن يلاحظ أن الأنواع الرخيصة الثمن من الزجاج غير مناسبة بشكل مطلق حيث تتحرر منها بعض المواد الضارة للمزرعة ويبدأ حدوث ذلك بعد فترة ١٢-١٨ شهر من التصنيع. وهناك بعض الطرق الكيميائية لإعادة الأوعية بعد هذه الفترة إلى حالتها الأولى أى قبل تحرر هذه المواد (George, 1993). أما البلاستيك فهو سهل الاستعمال لكن الأنواع

ذات القابلية للتعقيم الحرارى غالية الثمن. وعموماً على النطاق التجارى يستعمل الزجاج العادى أما فى أغراض البحث العلمى فيجب استعمال أنواع جيدة من الزجاج Invigorated (IG).

بالطبع يلزم تغطية الأوعية المستعملة لتجنب حدوث تلوث المزرعة لكن يجب عدم إحكام الغلق إذا كانت مادة الغطاء غير منفذة للغازات حتى يسمح بالتبادل الغازى لكن من الضرورى الحفاظ على عدم تلوث البيئة وعدم جفافها بدرجة عالية ويضيف (Jackson, 2003) أن النباتات فى الأوعية محكمة الغلق هى بمثابة النباتات النامية تحت سطح الماء، لكن فى الحالة الأخيرة فإن بعض النباتات قد تأقلمت على التغلب على هذه الظروف. ويتم صناعة الأغطية من مواد مختلفة مثل القطن والبلاستيك والمعادن كالالومنيوم. ويتوقف عدد مرات حدوث إحلال الغازات الداخلية بالغازات الخارجية على نوع مادة الغطاء. ويمكن رفع هذا المعدل ٣-٦ مرات باستعمال الأغشيه المنفذة مثل البولى بروبلين. وقد قورن معدل التبادل الغازى الحادث فى ساعة واحدة لأنابيب زراعة حجمها ٤٥ مل وذات قاع مسطح ومغطاة بغطاء من الألومونيوم أو البلاستيك أو المطاط فكانت ٠.١٨، ١.٥، ٠.٦ سم^{٣} على التوالى. لكن يجب الأخذ فى الاعتبار أن المواد البلاستيكية سواء كانت أوعية أو أغطية تتحلل منها بعض المواد المتطايرة التى تذوب فى البيئة وقد تؤثر على مدى استجابة المُستأصَل النباتى (George, 1993).

ولعل من المفيد أن يشار إلى دراسة Islam *et al.* (2005) حيث قام بإكثار عدة طرز وراثية من النعناع باستخدام أنواع مختلفة من الأوعية؛ هى برطمانات مصنوعة من الزجاج التجارى (IG) سعتها ٣٣٠ مل، وأوعية الزراعة المعروفة بـ Magenta vessels (MV) التى يتيح تصميم غطائها التبادل الغازى وسعتها ٣٨٠ مل، والدوارق المخروطية (EF) سعة ١٦٣ مل وأنابيب الزراعة سعة ٥٣ مل. وتم

تغطية البرطمانات بعد وضع قرص من القطن بين الغطاء والفوهة ليضمن التبادل الجيد للغازات، أما أنابيب الزراعة والدوارق فتم تغطيتها بورق الألمونيوم ضغط باليد حول الفوهة. وكان حجم البيئة المستعمل فى الأوعية السابقة هو ٥٠، و٤٠، و٣٠، و١٠مل على التوالى وزرع بكل وعاء ٥، و٥، و ٣ فى الثلاث أنواع الأولى من الأوعية أما النوع الرابع فزرع به مُستأصَل واحد (CT1) أو مُستأصَلين (CT2). وقد قام بقياس عدد هام من المتغيرات التى تأثرت بنوعية الأوعية (جدول رقم ٤-٩). ويتبين أن أعلى فقد فى وزن البيئة وكذلك البخر نتح ووزن للنباتات كا عند استعمال أوعية من الزجاج التجارى، بينما كان أقل نقص فى البيئة ووزن النباتات كان عند استعمال أنابيب زراعة تحتوى على مُستأصَلين نباتين. وبدون زراعة المُستأصَلات فى الأوعية كان الفقد فى البيئة وزيادة الفراغ الداخلى أعلى فى حالة الأوعية المصنوعة من الزجاج التجارى. وعموما كان أفضل نمو بزراعة النباتات فى الأوعية التى تضمن التهوية.

جدول ٤-٩: تأثير نوع الوعاء على مزارع القمم النامية للنعناع (Islam *et al.*, 2005).

الصفة	نوع الوعاء				
	IG	MV	EF	CT1	CT2
الفقد فى وزن المزرعة (جم)	٤.٨٢	٢.١٩	١.١٧	٢.١٦	١.١٠
وزن النباتات (جم)	١.٠١	٠.٩١	٠.٦٨	٠.٥٩	٠.٤٣
البخر نتح	٣.٨١	١.٢٩	٠.٥٠	١.٥٧	٠.٦٨
% للنقص فى البيئة	٢٠.٠	٩.٤٤	٨.٣٦	٧.٣٧	٧.٣٧
% لزيادة الفارغ الداخلى	١٠.٤٩	٥.٤٢	١١.١١	٣.٧٩	٣.٣٧
عدد الأوراق/نبات	٢٧.٣٢	٢٩.٠٦	٢٨.٦١	٢٧.٦٨	٢٢.٣٩

تقلل سرعة التبادل الغازى فى جو المزرعة من ظاهرة التميؤ الزجاجى وتحسن من النمو فى عديد من النباتات مثلا لبطاطس والطماطم و *Gypsophila paniculata* و *Dianthus caryophyllus* . من الأمثلة التى توضح أثر الغطاء على

زراعة الأنسجة كنتيجة لتأثيرها فى التبادل الغازى ومحتوى الرطوبة داخل الإناء ما أوضحه Tsuro *et al.* (2000) عند استعماله نظامين لتغطية الأوعية المستعملة لإكثار نباتات *Lavandule vera* الأول نظام مقفول closed culture system وفيه استعمل ورق الألمونيوم. أما النظام الثانى فهو النظام المفتوح open culture system حيث استعملت نفس المادة مع ترك فتحات مربعة الشكل طول ضلعها ٧ مم غطيت بمرشح ذو أقطار ٠.٢٥ ميكروميتر ليسمح بالتبادل الغازى. وأتضح أن الأشطاء التى تكونت فى النظام المفتوح كانت أكثر طولاً ولم تتضح فيها ظاهرة التميؤ الزجاجى وأرجع ذلك لخفض تركيز ثانى أكسيد الكربون فى الجو الداخلى ومنع تكثف بخار الماء على السطح الداخلى للوعاء. وامتد هذا التأثير إلى مرحلة التجذير، فالأشطاء التى تكونت فى النظام المفتوح كونت عدداً أكبر من الجذور مقابل ١-٥ جذر لكل نبات فقط فى النظام المقفول. كما كان هناك تداخل واضح بين النظام المتبع ومنظمات النمو المستعملة للتجذير. وكان لاختلاف القدرة على التجذير وظاهرة التميؤ الزجاجى ارتباط بالقدرة على الأقلمة حيث أمكن لـ ٩٥٪ من النباتات الناتجة من النظام المفتوح الأقلمة مقابل ٣٣٪ فقط للنباتات الناتجة من النظام المقفول.

كما يتباين حجم الأوعية المستعملة فى زراعة الأنسجة وهناك العديد من الأمثلة التى توضح تأثير حجم الوعاء على النمو والتكشف عن طريق:

أ. تأثيره على محتواه من الأكسجين وثانى أكسيد الكربون والإثيلين والمواد الطيارة الأخرى.

ب. اختلاف النسب المختلفة بين العناصر وبعضها وحجم المُستأصَل النباتى والفراغ الغازى وحجم البيئة.

ج. تأثيره على معدل انتشار الغازات من وإلى الوعاء.

وعادة يكون الوعاء الأكبر حجماً أفضل إذا كان معدل النمو عالى، أما إذا كان المُستأصَل النباتى صغير الحجم ومعدل النمو بطئ فيفضل الوعاء الأصغر حجماً.

ويقلل الإناء الأصغر حجماً من التكشف وقد يتعدى ذلك الأمر إلى تأثيره على مواصفات الأفرع المتكشفة، ففى مزرعة أشطاء نباتات *Gerbera* كانت الأشطاء الناتجة فى مخبار سعته ١٢٥ مل أفضل من تلك الناتجة من أنابيب ١٥٠/٢٥ مم وكان معدل التجذير أفضل عند استعمال أوعية سعة ٢٥٠ مل. بمعنى أن هناك حجم أمثل لكنه يختلف باختلاف النوع النباتى ونوع المزرعة ومرحلة زراعة الأنسجة ونوع مادة الإناء وحجم البيئة وكثافة الزراعة. كما يلعب شكل الإناء دوراً فى ذلك حيث يكون معدل انتشار الغازات أعلى فى الوعاء القصير بالمقارنة مع الطويل رغم أن كلاهما متساويان فى الحجم (Jackson, 2003).

٣. الغازات

خلال عقود طويلة افترض أن المكونات المختلفة للبيئة فى القوارير هى العناص الأساسية التى يمكن عن طريقها التحكم فى نمو وتطور الأنسجة. ومما لا شك فيه أن الهواء من ضروريات نمو النباتات فلا يمكن للأنسجة أن تعيش بدون الأكسجين، أما ثانى أكسيد الكربون فهو حجر الأساس فى عملية البناء الضوئى. والمكون الآخر الذى يوجد بنسبة عالية فى جو المزرعة هو الإثيلين والذى ينظر إليه الآن على أنه هرمون نمو وليس كمركب سام للخلايا حيث يؤثر فى النمو والتطور بمعدل يتراوح بين ٠.٠١ و ١٠ جزء فى المليون. لكن لا يقف الأمر عند ذلك حيث أصبح من الثابت أهمية دراسة الغازات المختلفة فى جو مزرعة الإكثار الدقيق، وقد تناول ذلك بالتفصيل (George (1993 و (Jackson, 2003) و (Zobayed (2005 فى مقالات مرجعية يمكن الجوع إليها للإطلاع على الكثير من المعلومات التى يناقشها هذا الجزء.

إن حاجة المزرعة للتهوية أو للتبادل الغازى بين جو المزرعة والفراغ الخارجى يعتمد على نوع المزرعة وحجمها. وتلعب النسبة بين حجم الأنسجة إلى حجم

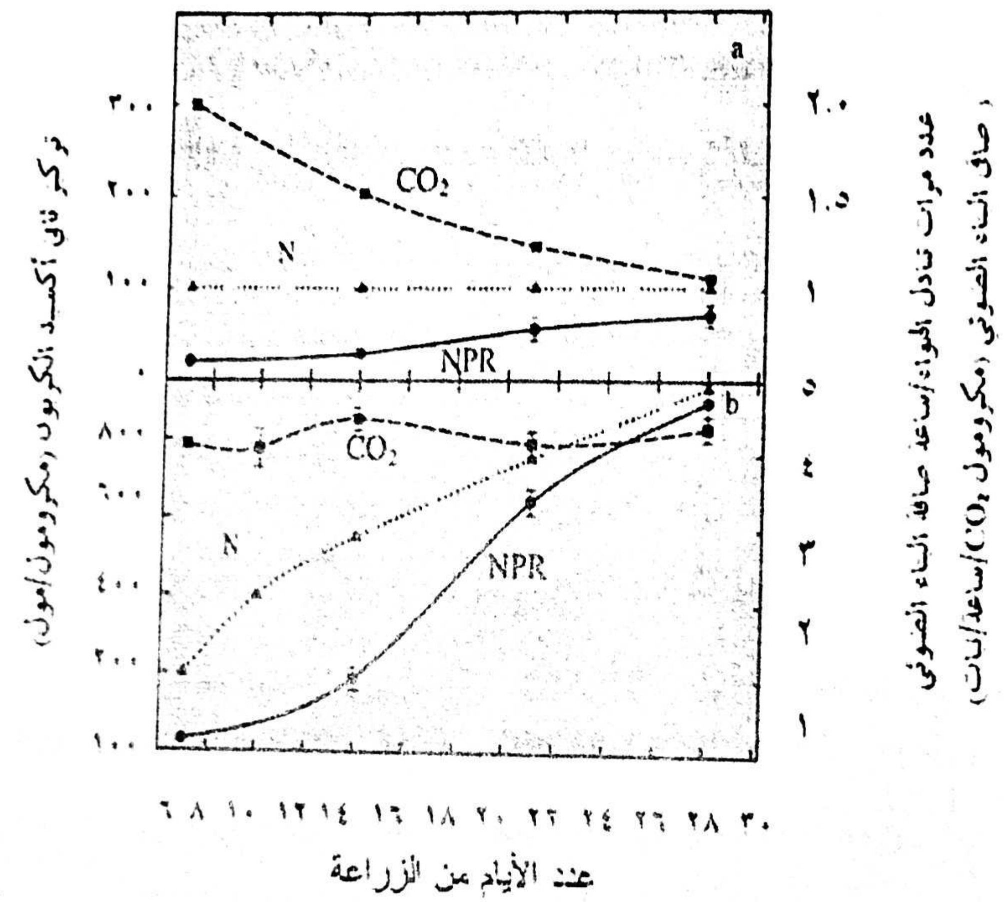
الوعاء دور هام جداً فى تأثير التبادل الغازى على نمو الأنسجة فالحجم الكبير للأنسجة يعنى أن صغر الفراغ المتاح للانتشار الغازى. ويتعدى الأمر ذلك حيث كبر حجم النسيج يعنى الانخفاض النسبى فى التبادل الغازى للأنسجة الداخلية الغير ملامسة للهواء. لكن يعتبر الحد من تبادل الغازات عبر نوعية الأوعية والأغطية على رأس تلك العوامل السابقة والذى لا يحرم المزرعة من المكونات الطبيعية للهواء بل يرفع من الرطوبة النسبية وتركيز بعض الغازات الناتجة من عمليات الأيض كالإثيلين وأكسيد النتريت وغيرها. ومن ثم يلاحظ تثبيط عالى فى عملية البناء الضونى، والنتح، وامتصاص الماء والذائبات من البيئة وكذلك ثانى أكسيد الكربون مع زيادة فى معدل التنفس فى فترة الظلام وينعكس ذلك فى النهاية على ضعف النمو والعديد من الصور غير الطبيعية فى الشكل المظهرى والتشريحى والوظيفى للنباتات فى القوارير. وهناك بعض المواد الطيارة الأخرى التى تخلق فى المزرعة مثل الإيثان، والميثان، والاسيتيلين، والاسيتالدهيد وقد تسبب بعض المشكلات، مثل الموت الموضعى للأنسجة وتثبيط نمو النباتات إن لم يتم التخلص منها بالتهوية الجيدة لجو المزرعة.

وعلى الرغم أن كمية قليلة من الغازات يمكن أن تدخل وتخرج من أوعية الزراعة بسبب التباين الحادث فى درجات الحرارة فى غرفة النمو إلا أنه يحدث تغيير ملحوظ فى المكونات الغازية فى جو الإناء المستعمل نتيجة للانتشار الغازى. ويتراوح معدل تدفق الغازات فى أوعية الزراعة بين ٠-٢٥ ملم/ساعة، ويتوقف ذلك على عدة عوامل منها شكل وحجم الإناء ومادة الغطاء ودرجات الحرارة وحركة الهواء الخارجى. ولعل عدم إحكام غلق الغطاء أو وضعه فقط فوق الفوهة دون غلقه يحسن بكثير معدل الانتشار الغازى، لكن قد يكون ذلك عامل كبير فى تلوث المزرعة خاصة لو كان السكر هو مصدر الكربون فى المزرعة. ويزيد معدل الانتشار الغازى بصورة ملحوظة باستعمال أشعة ضوئية ذات طول موجى قصير. كذلك فإن إضافة الفحم المنشط إلى البيئة يزيد من معدل التدفق الغازى حيث يعمل الفحم على امتصاص

الأشعة الضوئية مما يرفع من درجة حرارة البيئة فتتمدد الغازات الداخلية فيتم التبادل الغازى. وفى فترة الظلام ينكمش الهواء الداخلى ببرودة البيئة فتقل بمعدل ١-٣ درجات بالمقارنة بفترة الإضاءة رغم ثبات درجة حرارة الغرفة فى كلا الحالتين، فيدخل الهواء الخارجى وهكذا.

وتتوقف نسبة وجود الأكسجين فى جو المزرعة على معدل انتشاره وغالباً يكون تركيز الأكسجين فى سطح المُستأصَل النباتى مساوياً لنسبته فى جو المزرعة لو كانت الأنسجة غير متحركة ومحاطة بغشاء رقيق جداً من البيئة أما الأنسجة المغمورة فى البيئة الثابتة فيكون تركيز الأكسجين بها منخفضاً. ويزيد تركيز الاثيلين حول النسيج بزيادة سمك الغلاف المائى المحيط بالنسيج. ويمكن تغيير محتوى المزرعة من الأكسجين عن طريق تغيير تركيز الأكسجين فى غرفة الزراعة أو بدفع تيار من الأكسجين إلى داخل الأوعية. ومن الطبيعى أن ينخفض محتوى الأكسجين فى الأوعية محكمة الغلق حيث يستهلك جزء منه فى التنفس ولا يتم تعويضه بعملية البناء الضوئى. وبما أن النمو والتكشف يتأثران بالتنفس عن طريق عدد من التفاعلات الكيميائية فإن التغيير الحادث فى محتوى الأكسجين ينعكس أيضاً على النمو والتكشف. ويتبين أن الانتشار الغازى لا يكون كافياً فى معظم الحالات لتحقيق النمو الأمثل، ومن ثم يتم زيادة معدل التبادل الغازى أما بتشجيع التبادل الغازى بالانتشار الطبيعى عبر استخدام أغطية خاصة كتلك المصنوعة polypropylene وهى عديدة ومن حيث نوعيتها وسمكها وقطر الثقوب الدقيقة بها وبالتالى تختلف فيما بينها فى معدل تغير المحتوى الغازى الداخلى. لوقد استعمل البعض عدة طبقات من القطن، لكن قد يكون معدل الانتشار الغازى بهذه الوسيلة غير كافى خاصة فى الأوعية كبيرة الحجم نسبياً. ولزيادة هذا المعدل يمكن دفع تيار من الهواء أو ثانى أكسيد الكربون إلى جو المزرعة . ويتضح أن معدل تبادل الغاز فى حالة الاعتماد على التهوية الطبيعية متفاوت ويخضع للعديد من العوامل ولا يمكن التحكم فيه بدقة وعلى العكس من ذلك يمكن التحكم بدقة

فى معدل التبادل الغازى والرطوبة عن طريق دفع تيار من الهواء لفراغ المزرعة، ومن ثم يمكن الحصول على معدل نمو عالى (شكل رقم ٤-٧).



شكل ٤-٧: تركيز CO_2 وصافى عملية البناء الضوئى (NPR)، وعدد مرات تبادل الغازات (N) والكتلة الحيوية فى مزارع نباتات الكافور ذات الهوية الطبيعية أعلى وعن طريق دفع تيار من الهواء من أسفل (Zobayed, 2005).

ويشير الشكل إلى اختلاف تركيز الغازات داخل الوعاء المستخدم لزراعة نباتات *Eucalyptus* فى كلا النظامين وقد ارتبط ذلك بزيادة معدل البناء الضوئى والكتلة الحيوية للنبيتات. ويلاحظ أيضاً استهلاك ثانى أكسيد الكربون أثناء فترة الإضاءة عند استعمال التهوية بدفع تيار من الهواء مقارنة مع التهوية الطبيعية. لكن بزيادة معدل ثانى أكسيد الكربون الذى يتم دفعه للوعاء يمكن الحصول على ثابت فى تركيزه، وكذلك زيادة معدل النمو Zobayed *et al.* (2001) . وقد وضح Ivanova &

Van Staden (2010)أن لزيادة معدل التهوية دوراً بارزاً فى التغلب على ظاهرة التميز الزجاجى فى بعض نباتات *Aloe polyphylla* وكذلك زاد معدل التكشف وانخفضت نسبة نباتات *Dianthus caryphyllus* المتمنية زجاجياً خاصاً عند ارتفاع مستوى الفوسفات بالبيئة (Mohamed, 2011) . ويعتبر ذلك من أساسيات دفع النباتات بالمزرعة لتعتمد على نفسها فى تخليق السكر بعملية البناء الضوئى. وقد ناقش Zobayed (2005) العديد من الأنظمة التى صممت لرفع تركيز ثانى أكسيد الكربون فى جو المزرعة.

تقوم الأنسجة المنزرعة بالتنفس وبالتالى تنتج غاز ثانى أكسيد الكربون الذى قد يستهلك جزء منه فى البناء الضوئى إن كان هناك فرصة لحدوثه، حيث أن السكر وهو الهدف من عملية البناء الضوئى يتم إضافته للبيئة فتكون معظم الخلايا غير ذاتية التغذية. لكن بعض الأنسجة الخضراء وبعض الخلايا قد تكون ذاتية التغذية وتقوم بعملية البناء الضوئى وبالتالى يلعب تركيز ثانى أكسيد الكربون ودرجة الحرارة بالإضافة إلى الضوء دوراً فى نشاطها. ويبلغ تركيز ثانى أكسيد الكربون فى جو الغرفة ٠.٠٣٥% لكن يلاحظ ارتفاعه فى جو غرف الزراعة إلى٠.٠٤٠-٠.٠٨٠%، وليس من الضرورى أن تكون نسبة وجوده فى غرف الزراعة هى نفس نسبة وجودة فى داخل جو المزرعة حيث يتوقف ذلك على معدل الانتشار الغازى. وبالطبع إن كانت الأنسجة المنزرعة غير خضراء أى لا تقوم باستهلاك جزء من ثانى أكسيد الكربون فإن تركيزه يزيد وقد يصل إلى ١٥٠ مرة أعلى من تركيزه خارج جو المزرعة. وتزيد هذه النسبة إلى ١٠٠٠ مرة فى حالة الظلام وإحكام غلق المزرعة حيث يستمر التنفس وتقف عملية البناء.

إذا كانت الكثافة الضوئية منخفضة أو تركيز ثانى أكسيد الكربون غير كافى للبناء الضوئى فإن الأنسجة أو النبيتات تصل إلى أقل من نقطة التعويض

compensation point حيث يكون الصافى من عملية البناء غير كافى للتنفس ويؤدى ذلك إلى موت الأنسجة أو النبيتات. ورغم أن النبيتات الناتجة من زراعة الأنسجة تحتوى على نظام نقل إلكترونى فعال جداً لعملية البناء الضونى إلا أن الإنزيمات الضرورية لهذه العملية لا تكون كافية بالمقارنة مع النباتات العادية. وتختلف قدرة النبيتات فى مزارع الأنسجة فى القيام بعملية البناء الضونى فى حالة أضافه السكر للبيئة فنباتات *Dieffenbachia* على سبيل المثال لها قدرة على تكوين السكر حتى فى حالة إضافته للبيئة. ولوحظ أن معلق بعض الخلايا النباتية خصوصاً فى حالة الكثافة المنخفضة يحتاج إلى ثانى أكسيد الكربون. ويعود ذلك إلى أهميته فى تخليق بعض الأحماض العضوية والأمينية الهامة للنمو والتى لا يمكن تعويضها بمصدر خارجى. كذلك لوحظ تأثير ثانى أكسيد الكربون على التكشف المباشر من خلال تأثيره على تخليق الإثيلين، حيث أن ارتفاع تركيز ثانى أكسيد الكربون يزيد من تخليق الإثيلين ونفس التأثير المثبط للتركيز العالى من ثانى أكسيد الكربون أمكن إحداثه بإضافة المواد المثبطة لإنتاج الإثيلين.

٤. الرطوبة النسبية

الرطوبة النسبية هى مقياس لكمية بخار الماء الموجودة فى الغلاف الغازى منسوبة إلى الكمية الكلية من بخار الماء التى يمكن أن يتشبع بها هذا الغلاف الغازى. وفى بداية الأمر لم تلقى الرطوبة النسبية أهمية لدى المشتغلين بزراعة الأنسجة النباتية حتى تبين أثرها على ظاهرة التميؤ الزجاجى والنمو غير الطبيعى للأوراق. ويلاحظ عند استعمال الأوعية التقليدية وصول الرطوبة النسبية إلى معدل مرتفع جداً يصل إلى ١٠٠% فيلاحظ تكثيف قطرات الماء على السطح الداخلى للأوعية. ويترتب على ذلك الكثير من الآثار السلبية على النمو وربما التكشف (Mohamed & Alsadon, 2010b &2011).

ولا يمكن أن تناقش الرطوبة النسبية بمعزل عن تأثير الأوعية والغازات كما سبق ذكر ذلك آنفا، وفى معظم المقالات والدراسات المعملية يتم الربط بين الثلاثة عوامل ونمو المزرعة (George, 1993) و (Zobayed, 2005). فاستخدام الأوعية والأغطية التى تسمح بالتهوية حتماً ستقلل من الرطوبة النسبية الداخلية وقد تحسن من النمو وتزيد من نجاح نقل النباتات إلى البيت المحمى بشكل واضح، وربما يرجع ذلك ولو بصورة جزئية لزيادة معدل النتح ومن ثم امتصاص مكونات البيئة. فعند الإكثار الدقيق لنباتات القرنفل فى أوعية توفر تبادل غازى بمعدل ٠.١١، و ٠.٢١، و ٠.٦٨ ، و ٠.٨٦/ساعة من حجم الهواء الداخلى لوحظ أن هناك تغيير فى الصفات التشريحية لأوراق الأشطاء المتكشفة. وكان التركيب التشريحى للنباتات النامية فى أوعية توفر معدل عالى من تغيير الهواء الداخلى مقاربة للصفات التشريحية للنباتات النامية فى البيوت المحمية، حيث كانت الأوراق ذات طبقة كيوتيكل وجدر خلوية سميكة، لكن انخفض حجم الخلايا والمسافات البينية وزاد تركيز صبغات التمثيل الضوئى ووجود الأنسجة الدعامية. وتلك الصفات التشريحية ملازمة لزيادة معدل فقد الماء من النباتات والذى يزيد بزيادة معدل التهوية وأدت تلك الصفات التشريحية إلى ارتفاع نسبة النباتات التى أمكن أقلمتها. وتعمل التهوية على زيادة الجهد المائى للبيئة حيث تنخفض الرطوبة النسبية وقد يكون ذلك أحد أسباب اختفاء ظاهرة التميؤ الزجاجى بزيادة التهوية. وقد أوضح Fal *et al.* (1999) أن زيادة معدل التهوية يزيد من معدل تكوين الأشطاء الطبيعية فى صنفين من القرنفل.

وتتوقف الرطوبة النسبية داخل أوعية الزراعة على درجة حرارة البيئة وطبيعتها ومعدل التبادل الغازى والرطوبة النسبية لغرفة الزراعة. فإذا كانت درجة الحرارة داخل الفراغ الغازى للوعاء هى نفس حرارة غرفة الزراعة والوعاء محكم الغلق فإن الرطوبة النسبية تكون نظرياً ٩٨-٩٩.٥% أى أن الهواء الداخلى مشبع تماماً. لكن تنخفض الرطوبة النسبية بحدوث التبادل البخارى بين الفراغ الداخلى

والخارجى. وأفضل رطوبة نسبية لغرف الزراعة هى ٧٠% وانخفاضها عن ذلك يؤدى إلى جفاف البيئة. ورغم أن ارتفاع الرطوبة النسبية هو أحد العوامل الرئيسية لحدوث ظاهرة التميؤ الزجاجى إلا أن انخفاض الرطوبة النسبية داخل الأوعية إلى ٧٠-٨٠% غير ملائم لنمو معظم أنواع مزارع الأنسجة، فالأجنة الجسدية للجزر تموت إذا انخفضت الرطوبة إلى ٦٠% وكذلك قل عدد الأفرع المتكشفة من نبات *Pelargonium* عند انخفاض الرطوبة عن ٧٥%. وعند تنمية أفرع البطاطس لمدة ٢٢ يوم تحت مستويات مختلفة من الرطوبة النسبية شجعت الرطوبة النسبية العالية نمو الأفرع لكن انخفض حجم الورقة ولم يتأثر الوزن الجاف للنبات. وتؤدى التهوية بدفع تيار من الهواء داخل القوارير خفض الرطوبة النسبية بشكل كبير ينعكس بتأثير سلبى على النمو. ويمكن التغلب على ذلك بزيادة حجم البيئة فى القوارير، أو برفع الرطوبة النسبية فى غرفة النمو، أو بترطيب الهواء المستعمل فى عملية حقن المزرعة.

كما تتوقف الرطوبة النسبية داخل الفراغ الداخلى للوعاء على نسبة مساحة المسطح الورقى الموجود، فزيادة المسطح الورقى تزيد من معدل البخر وبذلك ترتفع الرطوبة النسبية. ومن ثم ينصح بزيادة عدد الأفرع المنزرعة عند استعمال أوعية كبيرة الحجم. ويمكن أن ترفع الرطوبة النسبية داخل الوعاء بوضع كأس به ماء داخل وعاء الزراعة وقد اتبع ذلك فى مزرعة لأفرع نبات *Chrysanthemum morifolium*. لكن قبل مرحلة نقل النباتات من المعمل إلى ظروف الأقلمة خارج المعمل يفضل خفض الرطوبة النسبية للمساعدة فى أقلمة النباتات وإن كان ذلك يعمل على خفض معدل النمو والتجذير.

٥. الحرارة

تتعرض النباتات فى البيئة الطبيعية إلى تباين فى درجات الحرارة على مدار الأربع والعشرين ساعة. ومن الأفضل أن تعرض مزارع الأنسجة إلى معدل متباين من

درجات الحرارة خلال الليل والنهار أى فى وقت الظلام والإضاءة إن أمكن ذلك. وقد لوحظ معدل أفضل للنمو والتكشف لعديد من النباتات عندما انخفضت درجة حرارة الليل إلى ٤-٨°م عن درجة حرارة النهار. لكن من الناحية التطبيقية تستعمل معظم المعامل درجة حرارة ثابتة ٢٢-٢٤°م طوال الأربع والعشرين ساعة للنباتات ثلاثية الكربون. أما النباتات رباعية الكربون والنباتات ذات الأيض الحامضى crassulacean acid metabolism (CAM) فربما تحتاج إلى رفع درجات الحرارة إلى ٣٥ ° م للحصول على أفضل نمو وتكشف(Amoo *et al*., 2009). وتتباين درجة الحرارة المثلى باختلاف النوع النباتى ونوع المزرعة ومرحلة النمو والغرض منها وغالباً تكون هذه الدرجة أعلى قليلاً من تلك الموجودة فى الحقل، فالنباتات الاستوائية تحتاج درجة حرارة ٢٤-٣٢°م بالمقارنة مع النباتات الواقعة فى المنطقة المعتدلة حيث تحتاج درجة حرارة ٢٠-٢٢° م. هذا مع الأخذ فى الاعتبار أن درجة الحرارة داخل الوعاء تكون أعلى عدة درجات عن تلك خارج الوعاء كما أن حرارة البيئة أعلى من درجة حرارة الفراغ الداخلى (George, 1993).

وقد كان نمو وتكوين أوراق جديدة لأشطاء النعناع عقب زراعة العقد الساقية أو القمم النامية أفضل عند درجة حرارة ٢٥°م بالمقارنة مع ٢٠°م،مع الأخذ فى الاعتبار الفروق بين الطرز الوراثية المختلفى التى استخدمها (Islam *et al*., 2005) فى دراسته. لكن وجد Amoo *et al*. (2009) تداخل بين تأثير الحرارة وعدد ساعات الإضاءة حيث قام بتقييم قدرة مُستأصَلات *Huernia hystrix* على التكشف ونمو الأشطاء تحت درجات حرارة متباينة مع استخدام إضاءة مستمرة لمدة ٢٤ ساعة أو تحت ١٦ ساعة ضوء يعقبها ٦ ساعات إظلام. وقد كان معدل التكشف ٢٨% عند درجة حرارة ١٥°م وارتفع إلى ٨٣% عند درجة ٢٠°م. وبالرغم عدم تأثير لدرجات الحرارة على النسبة المئوية للتكشف وعدد الأشطاء عند الإضاءة المستمرة، فإن رفع

درجة الحرارة من ٢٥°م إلى ٣٠°م قل من استطالة ووزن الأشطاء وكان ٣٨% من الأشطاء شاحبة اللون. أما عند نظام إضاءة ٨/١٦ فإن أفضل معدل لعدد الأشطاء وكذلك طولها ووزنها كان عند درجة حرارة ٣٥°م (جدول رقم ٤-١٠). وقد فسر ذلك بأن درجات الحرارة العالية تحت الإضاءة المستمرة تقلل من معدل تخليق ATP و NADPH فى النباتات ثلاثية الكربون، وبالتالى يقل معدل تثبيت ثانى أكسيد الكربون الضرورى للنمو. ويذكر الباحث أن انخفاض معدل النمو والتكشف عند درجة الحرارة المنخفضة قد يكون ذا أهمية فى حفظ الأنسجة فى القوارير، لأن قدرة هذه الأنسجة على النمو التكشف عند نقلها إلى درجة حرارة ٢٥° م كانت أفضل من تلك التى زرعت مباشرة على نفس درجة الحرارة. وكذلك هناك ملاحظات أخرى على التداخل بين درجات الحرارة والطاقة الضوئية على استطالة نبيتات البطاطس فى مزارع الأنسجة (Kozai *et al.*, 1995).

ولدراسة تأثير التغيير فى درجات الحرارة أثناء فترات الإظلام والإضاءة على نمو نبيتات البطاطس تحت جو مشبع بغاز ثانى أكسيد الكربون يصل تركيزه إلى ١٣٠٠-١٥٠٠ ميكرومول، باستعمال درجة حرارة ثابتة طوال اليوم ٢٠° م أو ١٥/٢٥°م أثناء فترات الإضاءة والإظلام على التوالى أو العكس أى أن المتوسط اليومى للحرارة هو ٢٠°م فى كل الحالات. ووجد أن طول الأفرع يزداد عند استعمال درجة حرارة أعلى ٢٥°م أثناء فترة الإضاءة و١٥°م أثناء والإظلام، لكن لم يكن هناك تأثير على الوزن الرطب والجاف. وفى نفس التجربة وجد أن هناك تداخل معنوى بين الفرق فى درجات حرارة الليل والنهار وشدة الإضاءة.

فى بعض الحالات تجب المعاملة بالبرودة لتشجيع التكشف أو النمو وكسر دور السكون الموجود فى بعض النباتات كالأشجار الخشبية والأبصال. فأبصال *Hemerocallis* و *Lilium* و *Hippeastrum* فى مرحلة النمو الثالثة من زراعة

جدول ٤- ١٠: تأثير درجات الحرارة وطول الفترة الضوئية على التكشف ونمو أشطاء نباتات *Huernia hystrix* كما سجلها Amoo *et al.* (2009).

درجة الحرارة (° م)	% للمستأصلات التى تكشفت		عدد الأشطاء/مستأصل		وزن الأشطاء/مستأصل (ملجرام)	
	عدد ساعات الإضاءة		عدد ساعات الإضاءة		عدد ساعات الإضاءة	
	١٦	٢٤	١٦	٢٤	١٦	٢٤
١٥	٢٨	لم تقاس	٠.٤	لم تقاس	لم تقاس	لم تقاس
٢٠	٨٣	لم تقاس	١.٨	لم تقاس	١١٤	لم تقاس
٢٥	٨٩	١٠٠	٢.٣	٤.٢	١٩٢	٦٩٠
٣٠	٩٤	٩٦	٢.٧	٤.١	٢٤٩	٥٦٩
٣٥	٩٤	١٠٠	٤.٢	٤.٢	١٩٢	٢٥١

الأنسجة يجب تعريضها لمدة ٥٠-١٤٠ يوم لدرجة حرارة ٥° م حسب مكونات البيئة. لكن وجد أن تقسيم أبصال *Freesia* إلى قسمين يمكن أن يحل محل البرودة، أما فى الأشجار الخشبية فإن المعاملة ببعض منظمات النمو مثل الجبريلين يمكن أن تحل محل البرودة. وفى بعض الحالات فإن المعاملة بالبرودة تكون ضرورية لدفع النباتات إلى التزهير بالذات النباتات ذات الحولين، فأفرع نباتات *Senecio* الناتجة من مزارع الأفرع تحتاج للمعاملة بدرجة حرارة ١٠° م فى المعمل لدفعها للإزهار بعد نقلها إلى خارج المعمل. كذلك تستعمل درجات الحرارة المنخفضة لتقليل معدل نمو النبيتات فى زراعة الأنسجة ويفضل أن يصاحب ذلك خفض الكثافة الضوئية. وأمكن حفظ نباتات البروكلى لمدة ٦ أسابيع بخفض درجة الحرارة إلى ٢°م وباستعمال كثافة ضوئية ٢ ميكرومول/م^{٢}/ثانية (George, 1993).

٦. الضوء

يعتبر الضوء عامل أساسى فى تكوين الصبغات الملونة للنبات فالبلاستيدات الناضجة توجد فى ثلاثة صور، إما خضراء لإحتوائها على الكلوروفيل، أو ملونة لإحتوائها على الصبغات الأخرى المسببة للون الأزهار والثمار، أو تكون البلاستيدات عديمة اللون كتلك المخزنة للمواد الغذائية مثل النشا أو الليبيدات. وعند حجب الضوء عن البلاستيدات الخضراء فإنها تفقد لونها وتتحول إلى عديمة اللون، والبلاستيدات عديمة اللون قد أن تتحول إلى خضراء عند تعرضها للضوء. والبادرات النامية فى الظلام تحتوى على بلاستيدات بها بعض التراكيب الداخلية المميزة للبلاستيدات الخضراء لكنها لا تحتوى على كلوروفيل. أما الكالس والخلايا المنزرعة معملياً فى الظلام على العكس من ذلك بها بلاستيدات لكنها لا تحتوى على التراكيب المميزة للبلاستيدات الخضراء أوالكلوروفيل. وعند نقل الكالس أو معلق الخلايا إلى الضوء فإن بعضه قد يكون الكلوروفيل ويبدأ فى عملية البناء الضوئى لكنه نادراً ما يصبح ذاتى التغذية الضوئية. وتستغرق عملية الاخضرار هذه وقت طويل نسبياً قد تستغرق ٨ أسابيع للوصول إلى أعلى محتوى كلوروفيلى بالمقارنة مع النباتات الكاملة التى تنقل من الظلام إلى الضوء. وتعتمد القدرة على تكوين الكلوروبلاست على وجود الخلايا غير المنقسمة فى كتل الخلايا. وتكوين المناطق الخضراء فى كتل الكالس يعتبر بداية عملية التكشف (George, 1993).

لكن على الرغم من عدم أهمية الإضاءة بالنسبة لعملية البناء الضوئى حتى إذا كانت المزرعة تحتوى على نباتات خضراء فإن نوعية وطريقة توزيع الإضاءة فى غرفة النمو له تأثير فعال على نمو المزرعة وجودة النباتات. وليس الأمر كذلك فحسب بل يمكن بتعديل شدة ونوعية الإضاءة التحكم فى نمو وتكشف مزارع البطاطس بطريقة تحاكى فعل منظمات النمو التى تقف وراء معظم التغيرات الوراثية فى مزارع القوارير (Seabrook, 2005). وترجع التأثيرات المختلفة للضوء على النباتات من حيث النمو

والتطور عموما إلى وجود نظامين متخصصين لاستقبال الطاقة الضوئية الأول blue light/UV-A والثانى مستقبل UV-B وهما يتأثران بنوعية وكمية الإضاءة. لكن على العكس من تأثير الضوء على النبات الكامل فإن المعلومات حول تأثير الضوء وبالأخص نوعية الضوء على مزارع الأنسجة لا تزال قليلة (Burritt& Leung, 2003) رغم إشارة الكثير من المراجع إلى أهمية الضوء فى مزارع الأنسجة.

وغالبا تستعمل لمبات الفلورسنت التى تثبت أفقيا فوق المزارع وأسفل الأرفف التى تحمل أوعية الزراعة للحصول على الإضاءة المناسبة وبطول موجى ٤٠٠-٧٠٠ نانوميتر. وتزود بعض الغرف أحيانا باللمبات العادية للحصول على جزء من الطول الموجى للمنطقة الحمراء. ويطلق على شدة الإضاءة المستعملة فى غرف النمووالتى تقاس حديثا بوحدات مكرومول/م٢/الثانية Photon flux density (PFD). وحتما تؤثر نوعية اللمبات وعددها وبعدها عن الأوعية على الطاقة الضوئية التى تصل إلى النباتات أو الأنسجة المنزرعة. وبالطبع يجب ألا ننسى نوعية الأوعية المستعملة فى الزراعة وكذلك الأغطية ومدى نفاذيتها للضوء، فمهما كانت نوعية الأوعية والأغطية فلا بد وأن تقلل من انتشار الضوء فى غرفة النمو وانتقاله من وعاء إلى آخر(Fujiwara *et al.* 1989). ومن العوامل التى تؤثر أيضا فى الإضاءة فى غرف النمو موضع الأوعيه على الأرفف ونوعية المادة المصنوعة منها وتأثيرها على امتصاص أو انعكاس الضوء (Nguyen & Kozai, 2005).

ويشير (2005) Chen أن تكاليف استهلاك الكهرباء فى مزارع الأنسجة تصل إلى ٦% من التكاليف الكلية وتصل تكاليف إضاءة غرف الزراعة إلى ٦٥% من هذه القيمة أما ال٣٥% الباقية فهى تكاليف التبريد. وللحد من تكاليف الإضاءة يمكن استعمال مزيدا من الأرفف لكن يسبب ذلك عدم انتظام فى توزيع الإضاءة للأوعية المختلفة. ومن البديهى أن الإضاءة المستعملة فى غرف النمو ينتج عنها قدر كبير من

الحرارة التى يجب التخلص منها بالتبريد مما يزيد تكاليف الإنتاج. وللحد من ارتفاع درجات الحرارة يتم وضع اللمبات خارج غرف النمو وتنقل الأشعة الضوئية بعد التخلص من طاقتها الحرارية خلال ألياف زجاجية إلى غرف النمو أو يتم النقل باستعمال عدسات لتركيز الأشعة ثم تنقل لغرفة النمو. وبالطبع تلك طرق مكلفة لكن من الناحية التطبيقية يجب تثبيت مصدر الإضاءة فى منطقة وسطى وغير ملامسة للأرفف الحاملة للأوعية. كما يمكن وضع اللمبات فقط داخل الغرف أما الأجزاء الملحقة بها والتى تولد قدراً كبيراً من الحرارة فتوضع خارج الغرفة. وفى بعض المعامل الكبرى يتم توزيع غرف النمو بحيث تكون فترات الإضاءة والإظلام فيها مختلفة ويتم سحب الهواء الساخن الموجود فى الغرف المضاءة ليستخدم فى تدفئة الغرف غير المضاءة وبالتالى الحدمن تكاليف التبريد والتسخين(George, 1993).

وتتعدد صور تأثير الضوء على نمو وتكشف النباتات وبعض العمليات الفسيولوجية المختلفة فى مزارع الأنسجة. والتى قد لا تتطلب امتصاص قدر كبير من الطاقة الضوئية لكن يمكن تحفيزها بالتعرض للضوء لمدة قصيرة. وقد يكون التأثير الضوئى غير مباشر عن طريق انتقال تأثيره فى النبات الأم إلى المُستأصَلا لنباتى أو مباشر على المُستأصَل النباتى. وجد Burritta & Leung (2003) أن حفظ النبات الأم فى أطوال موجية مختلفة لمدة أسبوعين قبل بدء *Begonia erythrophylla* زراعة الأنسجة يوثر بشدة على معدل استجابة أعناق الأوراق للبيئة وكذلك على عدد البراعم المتكشفة. فيذكر أن كل المُستأصَلات تقريباً كانت ذات قدرة على إنتاج حوالى ٣٠ نبات لكل مُستأصَل عندما نمت الأم فى الضوء العادى أو الأحمر، بينما انخفضت هذه النسبة إلى ٣٥ و ٣٠ و٧% عند نمو النبات الأم فى الضوء الأحمر البعيد والظلام والضوء الأزرق على التوالى، وكان عدد الأشطاء ١٥ و ١٠ و٣ لكل مُستأصَل. ومن الجدير بالذكر أن عدد كبير من المُستأصَلات التى أخذت من أمهات نمت فى الظلام ماتت عقب الزراعة بسبب زيادة تخليقها لمركبات عديدة الفينول. ومن الدراسة

التشريحية وجد أن التثبيط يحدث لمرحلة تكوين الخلايا الميرستيمية وليس لتطور منشآت الأشطاء. ولم يكن التثبيط الحادث بسبب الضوء الأزرق راجع مباشرة إلى نظام الفيتوكروم لتكشف عدد من الأشطاء عند الزراعة تحت خليط من الضوء الأزرق والأحمر. وعلى العكس من التثبيط الحادث من الضوء الأحمر البعيد كان التثبيط بالضوء الأزرق غير قابل للانعكاس.

وعموماً لا يثبط الضوء نمو معظم الأعضاء النباتية بل قد يكون ضروريا للنمو الأمثل. تختلف الحاجة للضوء على حسب مرحلة المزرعة فأحيانا يتطلب الأمر بدء المزرعة فى الضوء ثم نقلها للظلام أو العكس لحدوث استجابة معينة. فعلى سبيل المثال يتطلب إنتاج درنات دقيقة الحجم microtubers من بعض أصناف البطاطس زراعة النبيتات فى الظلام عقب تشجيع نمو السيقان فى الضوء (Piao *et al*., 2003). وأيضاً يلزم تطور أفرع من البراعم الزهرية لنباتات Freesia بدء المزرعة فى الظلام ثم نقلها إلى الضوء (Bach, 1987). لكن استنتج Clayton *et al.* (2003) عدم الحاجة إلى الضوء فى المراحل الأولى من زراعة القمم النامية للموز. أما Zambre *et al.*(2003) فيشير إلى أهمية الضوء فى عملية نقل الجينات عند استعمال بكتيريا *Agrobacterium* فى التحويل الوراثى للفاصوليا والارابدوبسس. وينظر إلى تأثير الضوء على زراعة الأنسجة من ثلاثة أوجه وهى:

أ. الطول الموجى

يتكون الضوء العادى من عدة أطياف يمكن فصلها عن بعضها البعض ودراسة تأثير كلاً منها على النمو والتكشف، لكن المتبع فى معظم حالات زراعة الأنسجة هو الإضاءة بلمبات الفلورسنت. والأطوال الموجية التى تؤثر على التكشف فى القوارير كما ذكر Hart (1988) هى القريبة من فوق البنفسجية (٣٠٠-٣٨٠ نانوميتر)، الزرقاء (٤٣٠-٤٩٠ نانوميتر)، والحمراء (٦٤٠-٧٠٠ نانوميتر)، والحمراء البعيدة

(٧٠٠-٧٦٠ نانوميتر) أما الأطوال الموجية من ٤٠٠-٧٠٠ نانوميتر فى المؤثرة فى البناء الضوئى. ويتوقف الطول الموجى الذى تستقبله المزرعة على نوعية اللمبات المستخدمة وكذلك على نوعية الأوعية فى غرف النمو. وتنتج لمبات الفلورسنت كمية أقل من الضوء الأحمر البعيد بالمقارنة مع لمبات الصوديوم. وتعتبر الأولى مناسبة لغرف الزراعة عند تثبيتها موازية للأرفف وعلى ارتفاع ٤٠-٥٠ سم من سطح المزرعة (Nguyen & Kozai (2005. وتوثر النسبة بين الطاقة الضوئية فى منطقة الضوء الأحمر والأحمر البعيد وكذلك نسبة الفوتونات فى المنطقة الحمراء إلى الزرقاء على النمو والتكشف. وقد ذكر (Nguyen & Kozai (2005 تشجيع تجذير عقل أشجار *Azalia* عند استخدام الضوء الأحمر أو الأحمر البعيد وليس الضوء الأبيض البارد باستعمال لمبات الفلورسنت. كذلك شجع الضوء الأحمر تكوين الأشطاء ونموها فى مزارع الجزر بينما تثبيط نمو الجذور من الأجنة الجسدية. ومن هذا يتضح مدى التباين بين تأثير الضوء الأحمر والأحمر البعيد والأزرق على التكشف، وربما يرتبط ذلك بالنوع النباتى (Burritta & Leung, 2003).

بدراسة التكشف فى بعض النباتات وجد أن الضوء الأحمر يتحكم فى السيادة القمية بينما يتحكم الضوء الأزرق فى عدد البراعم التى تتكون على المُستأصَل عبر نظام استقبالى مختلف (Muleo *et al*., 2001). وكذلك وجد (Kintzios *et al*. (2000 أن حفظ مزرعة أوراق نباتات *Capsicum annuum* لمدة ثلاثة أسابيع عقب الزراعة فى الظلام يزيد من عدد الأجنة الجسدية. لكن قد يتداخل تأثير الضوء مع العوامل الأخرى التى سبق الإشارة إليها حيث كان عدد الأجنة المتكون من الورقة الثالثة أقل من ذلك العدد المتكون من الورقة الأولى أو الثانية. لم يكن هناك فرق فى عدد الأجنة المتكون فى أنسجة من الورقة الثانية والثالثة عند حفظ المزرعة تحت ٦/١٨ ضوء/ظلام.

ونوه عدد من الباحثين إلى أن حفظ المزرعة فى ضوء خافت يساعد على تكوين الأجنة الجسدية وتكشف الأشطاء فى عدد من النباتات مثل *Cucmis melo* و *C.sativus* و *Rosa*. لكن تختلف هذه المدة وشدة الإضاءة المثلى باختلاف الأنواع. وعلى الرغم من أن كالس الدخان يستجيب إيجابياً إلى الإضاءة المنخفضة الزرقاء أو القريبة من فوق البنفسجية فإن التكشف والنمو الأمثل للأشطاء يحدث عند التعرض إلى الضوء الكامل أو منطقة الضوء الأحمر. وغالباً يتم تنشيط تكوين الكالس فى الظلام وبعد ذلك ينقل إلى الضوء لدفعه للتكشف. وقد يؤدى الضوء الأزرق بكثافة عالية إلى تثبيط انقسام خلايا الكالس. ويرجع ذلك إلى التداخل بين منظمات النمو خاصة الأوكسينات والأطوال الموجية المختلفة، ففى مزارع Artichoke يزيد 2.4-D من حساسية الخلايا للضوء وفى غيابه لا يحدث التأثير المثبط للضوء. والأكثر من هذا يوجد طور معين فى مرحلة انقسام الخلايا يكون حساساً للضوء دون غيره من أطوار الانقسام حيث يؤثر الضوء على تضاعف المادة الوراثية للخلية (George, 1993). وقد فسر تأثير الضوء على مرحلة الكالس والتكشف بعدد من التفسيرات (George, 1993) و (Seabrook, 2005):

- زيادة إنتاج المواد الفينولية التى تعيق نشاط معظم منظمات النمو.
- هدم إنزيم السيتوكروم اكسيديز المشترك فى عملية التنفس.
- تكسير الحديد غير المخلبي وكذلك أكسدة المركبات المخلبية فى البيئة.
- تنشيط تخليق حامض الجبريللين وقد تأكد ذلك بالتغلب على التأثير المثبط للضوء بإضافة إحدى المواد المثبطة لتخليق الجبريللين.
- قد يسبب الضوء رفع الرقم الهيدروجينى لبيئة MS إلى ٧.
- تثبيط تخليق السيتوكينينات وتنشيط هدم أندول حامض الخليك وحامض الأبسيسك.

- يؤثر التفاعل بين الضوء الأحمر وIAA على تثبيط نمو الأشطاء وتكوين الدرنات فى البطاطس. بينما يشجع الكنيتين فى وجود الضوء الأزرق تكوين الدرنات.

ومن التأثيرات الواضحة أيضاً للطول الموجي فى زراعة الأنسجة ما لوحظ عند زراعة عقل ساقية من البطاطس تحتوى على برعم واحد فى غرف مضاءة بلمبات فلورسنت أو لمبات عادية. فكانت النباتات الناتجة باستخدام اللمبات العادية أطول سوقاً وأوراقها أكبر حجماً وأكثر عدداً. وفى العديد من النباتات المنزرعة معمليا يمكن أن ينعكس تأثير الضوء الأزرق عندما يتبع بالضوء الأحمر الذى قد يعطى تأثير مشابه للسيتوكينينات فى تكشف الأفرع، لكن بعض الدراسات أثبتت أن بعض النباتات لها استجابة مخالفة لذلك. وللضوء تأثير على عملية تكوين الجذور فى زراعة الأنسجة لكن يقع ذلك تحت نظام تحكم فيتوكرومى آخر خلاف النظام المؤثر فى تكشف الأفرع. وتوجد صبغات الفيتوكروم فى صورتين Pfr والتى تتكسر أثناء فترة الظلام أو التعرض للضوء الأحمر البعيد وتتحول إلى الصورة الأخرى المعروفة بـ Pr. ولوحظ أن النباتات النامية فى نهار طويل تحتوى على كمية أعلى من IAA مقارنة بتلك النامية تحت النهار القصير. فتعريض مزارع *Polianthus tuberosa* لطول موجى ٦٦٠ انجستروم ينشط تكوين الجذور على الأفرع. لكن كانت أحسن ظروف لتجذير نباتات *Rhododendron* الناتجة من زراعة الأنسجة هو تعريض الأفرع لمدة أسبوعين للأشعة الحمراء البعيدة ثم الأشعة الحمراء لمدة أسبوعين (George, 1993).

قارن Nhut *et al.* (2003) تأثير استعمال الضوء الأزرق أو الأحمر مع ضوء الفلورسنت العادى على نمو أفرع مكونة من ثلاث وريقات ناتجة من زراعة أنسجة نباتات الفراولة صنف ‘Akihime’ حيث زرعت الأفرع فى بيئة MS الخالية من السكر وفى جو مشبع بغاز ثانى أكسيد الكربون لحث الأفرع لتكون ذاتية التغذية الضوئية. وتم استعمال مصدر للضوء الأحمر أو الأزرق من النوع light emitting

diodes (LED)، ويمتاز هذا النوع من المصابيح بصغر حجمه وتركيبه الصلب وطول عمره. وكانت الكثافة الضوئية فى جميع الحالات ثابتة وقدرها ٤٥ ميكرومول/م٢/ثانية. وبعد أربعة أسابيع من النمو لم يلاحظ تغيير فى طبيعة النمو بين النباتات النامية تحت الأنواع المختلفة من الضوء كما فى جدول رقم (٤-١١). ويتبين أن الضوء الخليط من الأحمر والأزرق كان أفضل لنمو النباتات لكن لم يكن هناك فرق معنوى فى عدد الجذور عند استعمال أطوال موجية مختلفة.

جدول ٤-١١: تأثير نوعية الضوء على نمو أفرع من نباتات الفراولة الناتجة من زراعة الأنسجة (Nhut *et al.*, 2003).

نوع الضوء	عدد الأوراق	الوزن الجاف	النمو الخضرى	الوزن الطازج (جم)		محتوى الكلوروفيل*	طول الجذور (سم)	عدد الجذور	طول النبات (سم)
		الجذور		الجذور	الأفرع				
أحمر	٠.٣	١٣.١	١.٥	١٨٠.٨	٣٢.٩	١.٣	١.٥	٦.٢	٣.٨
أزرق	١.٥	١٥.٤	٤.٣	١٨٥.٩	٣٥.١	٢.٠	٢.٧	٧.٩	٤.٣
خليط	٠.٩	١٦.٣	٧.٦	١٧٦.٩	٣٩.٦	٢.٨	٢.٧	٧.١	٤.٦
فلورسنت	٠.٥	١٦.٨	٥.٥	١٦٨.٠	٣٨.٠	٢.٣	٢.٩	٦.٥	٤.٠

*محتوى الكلوروفيل فى الورقة الثالثة من أعلى لأسفل مقدرة بوحدات SPAD

هذا وقد أوضح Le-Guen Le-Saos *et al.* (2002) أن نوعية الضوء المستعملة فى غرف النمو لها تأثير على تكوين الأبصال، حيث قام بمقارنة تكوين الأبصال فى نباتات *Allium cepa* تحت ضوء الفلورسنت وخليط مكون من الضوء الفلورسنت وضوء المصابيح العادية والمعروفة باسم Incandescent. وبعد شهر من زراعة الأجزاء النباتية لوحظ أن هناك فروقاً معنوية فى الشكل الظاهرى بين المجموعتين وازداد هذا الفرق بتقدم عمر المزرعة. ولم يزد معدل التبصيل فى النباتات النامية تحت ضوء الفلورسنت عن ٢% أما بعد ٣٠ يوم من النمو فى الضوء الخليط

ارتفع معدل تكوين الأبصال إلى ٨٩% وأصبحت ١٠٠% بعد ٩٠ يوم. وتلازمت الزيادة فى معدل تكوين الأبصال بالزيادة فى الوزن الرطب والجاف للأبصال. وجفت الأوراق تماماً بعد ٩٠ يوما مما يعنى تمام نضج الأبصال المتكونة. وقد وضح تأثير الأطوال الموجية المختلفة على نمو وتكوين الدرنات فى البطاطس (Seabrook, 2005).

ب. طول الفترة الضوئية

ويقصد بها تعاقب فترة الضوء والظلام خلال الأربع والعشرين ساعة وهى تؤثر فى النبات مباشرة إما عن طريق تنظيم كمية الطاقة الضوئية المعرض لها النبات أو عن طريق التأثير فى ميكانيكيات أخرى داخل النبات بحيث يدرك بها التغيير فى الظروف البيئية. ومن المعروف أن فترة الظلام هى الأهم وليس طول فترة الإضاءة وقد عرض Seabrook (2005) مزارع البطاطس لفترات ضوء/ظلام بالطريقة التالية: ٨/١٦ و ١/٤ و ٠.٥/١ بحيث كانت كمية الطاقة الكلية ثابتة خلال اليوم. وكان الوزن الجاف أعلى عند تقصير فترات الإضاءة. لوحظت الاستجابات الآتية للنباتات النامية تحت ظروف طول الفترة الضوئية فى مزارع الأنسجة:

- أدى النهار الطويل إلى تكوين عدد أكثر من أفرع *Pelargonium* وكانت الأفرع أكثر سمكاً ووزناً واحتواءً على الكلوروفيل بالمقارنة مع تلك النامية فى النهار القصير.
- يكون معدل نمو الجذور أفضل فى اليوم القصير ولكن هذه الظروف تؤدى إلى الاستطالة الإظلامية للأفرع مما يقلل من نسبة نجاح الأقلمة. وعموماً يمكن التغلب على هذه المشكلة بجعل الجزء المحتوى على البيئة من وعاء الزراعة مظلم وذلك إما بتغطيتها بورق ألومونيوم أو إضافة الفحم النباتى.
- رغم أن نسبة تكشف الأفرع تزداد فى اليوم الطويل فإن عدد ساعات الإضاءة الأمثل يختلف من نوع نباتى إلى آخر. وليس من الواضح ما إذا كان هذا التأثير الإيجابى راجعاً إلى عدد ساعات الإضاءة أم إلى ساعات الإظلام.

- لا يتحول الكالس الناتج من أنسجة بعض النباتات مثل نبات *Pelargonium* إلى اللون الأخضر ولا يتم فيه التكشف فى الضوء المستمر لكن يتم التحول إلى اللون الأخضر والتكشف عند التعرض لـ ١٥-١٦ ساعة فقط ضوء يوميا.

ج. شدة الإضاءة

وتعني الكثافة الضوئية التى تتعرض لها المزرعة وهى مختلفة عن الطول الموجى والفترة الضوئية، وتؤثر شدة الإضاءة على كمية الطاقة الضوئية الكليةالتى تستقبلها المزرعة. وتلعب الكثافة الضوئية دور هام فى تكوين الكلوروفيل فى الكالس والأنسجة المنزرعة وبذلك تعتبر عاملاً محدد للنمو خاصة فى المزارع الذاتية التغذية إذ تزيد شدة الإضاءة من عملية البناءالضوئى. إلا أنه لا يعتمد على عملية البناء الضوئى فى زراعة الأنسجة، حيث أن شدة الإضاءة المستعملة فى غرف زراعة الأنسجة تكون أقل عشر مرات عن تلك الموجودة فى الظروف الطبيعية، وكمية الضوء النافذة خلال الأوعية والأغطية تكون أقل من تلك التى يتم قياسها فى غرفة النمو، بالإضافة لاختلاف الطول الموجى للضوء المستعمل عن الضوء العادى. وتجدر الإشارة هنا إلى ضرورة قياس شدة الإضاءة باستمرار فى غرف النمو حيث أن شدة الإضاءة الناتجة من لمبات الفلورسنت الشائع استعمالها تنخفض بطول فترة استعمالها. وقد قدر هذا الانخفاض بحوالى ٧% بعد ٨ أيام و ١٤% بعد ٤ شهور و ٣٠% بعد ١٢ شهر من الاستعمال. لذا يجب تغيير لمبات الإضاءة على فترت لا تتجاوز الأربعة أشهر.

وقد قام Kitaya *et al.* (1995) بقياس تأثير شدة الإضاءة التى تصل إلى مزرعة بطاطس ذاتية التغذية الضوئية ولاحظ أن نمو الأشطاء والشكل الظاهرى للنباتات يختلف على أساس طريقة وضع مصدر الضوء. والشائع تركيب اللمبات أعلى المزرعة لكن هذه الطريقة ليست هى الأفضل لنمو المزرعة. بل من الأفضل وضع الأوعية فى صفوف ووضع اللمبات بجوارها مباشرة وقد لاحظ أن أشطاء البطاطس

فى هذه الحالة كانت أقصر عن تلك عند استعمال الإضاءة من أعلى. لكن لم ينعكس ذلك على الوزن الرطب والجاف ولا على المساحة الورقية، رغم أن الكثافة الضوئية فى داخل الأوعية هذه الحالة كانت أعلى خمس مرات عنها فى حالة الإضاءة من أعلى، مع ثبات عدد اللمبات فى كلا الحالتين. وقد سجل زيادة فى صفات السابقة برفع شدة الإضاءة إلى ٩٠ مكرومول/م٢/ث ثم انخفض النمو بزيادة شدة الإضاءة عن ذلك. لكن لم تشير الدراسة إلى درجة الحرارة داخل الأوعية التى ستتأثر حتما بمكان وضع اللمبات.

ويبين Economou & Read (1987) أن شدة الإضاءة المثلى تختلف باختلاف النوع النباتى، حيثي شجع الضوء تكوين الجذور والأشطاء فى بعض النباتات بينما ثبط الضوء تكوين الجذور فى البعض والراجع لتكسير IAA الداخلى (Schneider, 2005)، ويشير Nguyen & Kozai (2005) أيضاً إلى أن تأثير الضوء يرتبط غالباً بكمية ثانى أكسيد الكربون المتاحة وكمية السكر بالبيئة. وربما تستجيب الكثير من النباتات إلى زيادة شدة الإضاءة خاصة فى المزارع ذاتية أو خليطة التغذية الضوئية (أنظر الفصل التالى) فبرفع شدة الإضاءة إلى ٢٠٠ زاد عدد الأوراق وكمية الكلوروفيل ومحتوى السكر وصافى عملية البناء الضوئى لنباتات *Limonium* وكذلك زاد معدل الأقلمة بالمقارنة مع حفظ المزرعة ذاتية التغذية الضوئية عند شدة إضاءة نصف السابقة. لكن لم يتأثر النمو بشدة الإضاءة فى المزارع الغير ذاتية التغذية (Lian *et al.*, 2002). لكن بزيادة الكثافة الضوئية إلى ٢١٠ تسبب التثبيط الضوئى لعملية البناء الضوئى فى انخفاض نمو وتكشف أشطاء نباتات *Cynara scolymus* كما يشير (Schneider, 2005). وقد قام Nhut *et al.* (2003) فى نفس التجربة التى سبق الإشارة إليها عند الحديث عن نوعية الضوء بمقارنة ثلاث كثافات ضوئية ٤٥، ٦٠ أو ٧٥ ميكرومول/م^{٢}/ثانية وذلك بخلط ١٠% من الضوء الأزرق مع ٩٠% من الضوء الأحمر. وتوضح النتائج المبينة فى جدول رقم (٤-١٢) أن ارتفاع النباتات وعدد

الجذور كان أفضل فى الكثافة المنخفضة بينما كان عدد الأوراق وطول الجذور والوزن الرطب للنبات ومحتوى الكلوروفيل أعلى فى الكثافة الضوئية المتوسطة.

جدول ٤-١٢: تأثير الكثافة الضوئية على نمو أفرع من نباتات الفراولة الناتجة من زراعة الأنسجة.

الكثافة الضوئية ميكرومول/م^{2}/ثانية	عدد الأوراق	وزن طازج (جم)		وزن جاف (جم)		محتوى الكلوروفيل*	طول الجذور (سم)	عدد الجذور	ارتفاع النبات (سم)
		الجذور	الخضرى	الجذور	الخضرى				
٤٥	٤.٢	٤.٤	١٧٧	٠.٤	١٤	٣٦.١	٢.٠	٣.١	٦.٩
٦٠	٤.٥	٦.٣	١٨٤	١.٦	١٧	٣٨.١	٢.٣	٢.٩	٧.٣
٧٥	٤.١	٥.٥	١٧٢	٠.٥	١٧	٣٧.٤	٢.٤	٢.٨	٦.٩

*محتوى الكلوروفيل فى الورقة الثالثة من أعلى لأسفل مقاس بوحدات SPAD

وفى عدة دراسات لتأثير شدة الإضاءة على مزارع الأنسجة اشار (George, 1993) إلى التأثيرات الآتية:

- أدت شدة الإضاءة إلى تثبيط نمو الكالس فى بعض أنواع *Pelargonium* بسبب زيادة إنتاج المواد الفينولية وتثبيط تخليق الهرمونات.
- تحتاج أصناف محددة من *Chrysanthemum* دون الأصناف الأخرى إلى كثافة ضوئية عالية لتكوين أشطاء. وبعض الأصناف تحتاج إلى كثافة عالية فى البداية ثم كثافة منخفضة.
- يتطلب تكوين البراعم الزهرية فى أغلب النباتات كثافة ضوئية عالية بالإضافة إلى أهمية الفترة الضوئية.

٧. المجال الكهربائى والمغناطيسى

لقد نال تأثير المجال المغناطيسى والكهربى المغناطيسى electromagnetic field (EMF) سواء الثابت أو المتردد وبالأخص ذو التردد العالى اهتمام بعض الباحثين فى مجال زراعة الأنسجة فى الآونة الأخيرة، وذلك لما عرف من تأثيره

المتباين علي النباتات والحيوانات والكائنات الدقيقة (Atak *et al.*, 2007). ومن الثابت انه يؤثر على إنبات الكثير من البذور ونمو البادرات (Ruzic *et al.*, 1993) وقد سجل الكثير تأثيراته الايجابية على النمو والإنتاج للعديد من المحاصيل. فقد وجد Singh *et al.*, (1996) تغيير فى تركيب الماء عند تعريض لمجال مغناطيسى كهربى قوته 50Hz وبذلك تحدث تغييرات مورفولوجية وسيتولوجية فى الخلايا. وأشارت أبحاث كثيرة الى أن EMF يغير من خواص الغشاء الخلوى ونفاذيته للأيونات وبالتالى تجميعها داخل الخلية ومن ثم تأثيرها على الضغط الأسموزى، والتعبير الجينى، وتخليق البروتين، ونشاط الإنزيمات، والعديد من عمليات الأيض (Phillips *et al.*, 1992 و Stange *et al.*, 2002) و (Hirota *et al.*, 1999) و (Răcuciu *et al.*, 2008). لكن رغم اثبات البعض تأثير المجال المغناطيسى على مزارع الأنسجة فإن التفسير الدقيق لذالك لم يحدد بشكل تام (Dao-liang *et al.* 2009) .

ويشير Atak *et al.* (2007) أن الدراسات السابقة بينت حدوث تغيير فى طول مرحلة التهيؤ الأول G1 للخلايا الميرستيمية عند تعريضها لمجال مغناطيسى. وتزامن ذلك مع معدل عالى من تخليق البروتين وRNA وقد قدرت عدد الإنزيمات التى تأثرت فى تلك الدراسات بحوالى ٥٠ إنزيم من بينها تلك المنوط بها تكوين الشوارد الحرة أثناء تفاعلات الهدم وأخرى مثل البيروكسيدز المعروف بدورة فى مقاومة الإجهاد الملحى والمائى. ولا يتوقف دور البيروكسيدز عند هذا الحد بل لها علاقة غير مباشرة بالتكشف فى مزارع الأنسجة من خلال تأثيرها على أيض الأوكسينات والسيتوكينينات (köse. (2007. إلا أنه بتعريض معلق خلايا الدخان فى مرحلة النمو اللوغارتمى لمجال مغناطيسى ثابت شدته 10 mT أو 30 mT لمدة خمس ساعات فى اليوم وقف نمو الخلايا وزاد معدل الموت وتزامن ذلك مع نشاط إنزيم البيروكسيدز وتكوين اللجنين فى الخلايا (Abdolmaleki *et al.*, 2007) .

زرع (2009) Dao-liang *et al.* العقد الساقية لأشجار *Prunus maritime* بعد تعرضها لمدة عشر دقائق لمجال مغناطيسى يتراوح بين ٤٨ و ١٥٥ كيلوامبير/دقيقة. ووجد أن تعريض العقد الساقية لمجال شدته ٩٧ ضاعف معدل تكشف الأشطاء لكن انخفض عدد الأشطاء عند زيادة شدة المجال عن ٩٧. وبالمقارنه مع الشاهد ارتفع معدل التكشف ٣.٢ ضعف حيث وصل عدد الأشطاء إلى ١٧ لكل مُستأصَل نباتى عند التعرض لمجال شدته ٩٧. ولم يتوقف الأمر عند ذلك بل كان للمعاملة تأثير ايجابى على وزن وطول الأشطاء والجذور. ومن الجدير بالذكر أن النسبة بين الوزن الرطب والجاف للأشطاء توضح ثبات معدل امتصاص الايونات رغم زيادة امتصاص الماء عند التعرض للمجال المغناطيسى. درس Rakosy-Tican *et al.* (2005) تأثير تعريض مزارع العقد الساقية والقمم النامية لصنف البطاطس Désirée لفترات مختلفة وفى مواعيد مختلفة من عمر المزرعة لمجال مغناطيسيى ضعيف جداً. وقد تباين التأثير بين تثبيط وتشجع لنمو الأوراق والسوق والجذور على أساس مدة التعرض للمجال هل ١٤ أم ٢٨ يوم. وقد تأثير محتوى الأوراق من صبغات البناء الضوئى. وقد لاحظ أيضا اختلاف فى معدل نمو الأوراق على العقد الساقية لأجناس البطاطس البرية *Solanum chacoense* و *S. microdontum* و *S. verrucosum* عقب تسعة أيام من التعرض للمجال. إلا أن عدد القمم الميرستيمية فى المُستأصَل والمغناطيسية الأرضية geomagnetic كان ذو تأثير معنوى فى استجابة المزرعة.

كما اهتم البعض بدراسة تأثير المجال المغناطيسى والذى قد يتولد طبيعياً نتيجة مرور التيار الكهربى فى غرف النمو أوبوضع المزارع داخل مجال مغناطيسى. فلا يقف تأثير الإضاءة الموجودة فى غرف النمو على النمو والتكشف بفعل الضوء فقط لكن يتولد من ملحقات لمبات الفلورسنت وهى الأكثر شيوعا فى الاستخدام مجالاً مغناطيسياً. وتتفاوت شدة هذا المجال عند الأرفف المختلفة فى غرف النمو على أساس القرب أوالبعد عن المصدر. وأدى التعرض لمجال مغناطيسى كهربى إلى زيادة الأفرع

ونسبة التجذير وطول الأشطاء ووزنها فى نباتات *Prunus cerasifera* وزاد عدد الأشطاء والجذور فى نباتات *Aloe arborescens*. ولوحظ انخفاض فى عدد الأجنة الجسدية المتكونة وكذلك نسبة إنباتها فى *Quercus suber* عند وضعها فى مجال ضعيف قدره 50 Hz, 15 mT ويتوقف مدى هذا الانخفاض على التركيب الوراثى المستعمل. وقد أرجع ذلك إلى تأثير المجال الكهربى على القطبية (Celestino *et al.*, 1998).

وفى بعض الدراسات وجدت زيادة كبيرة فى نمو الكالس الناتج من زراعة أنسجة نبات الدخان عند تمرير مجال كهربائى ضعيف شدته ١ ميكروامبير بين الأنسجة المنزرعة والبيئة. ويتوقف هذا التأثير على موقع الطرف السالب والموجب للتيار فعندما جعل الكالس ناحية القطب السالب زاد نموه بمقدار ٧٠% وعند عكس اتجاه التيار كانت الزيادة قليلة جداً.

الفصل الخامس
مرحلتى تأسيس المزرعة والأقلمة

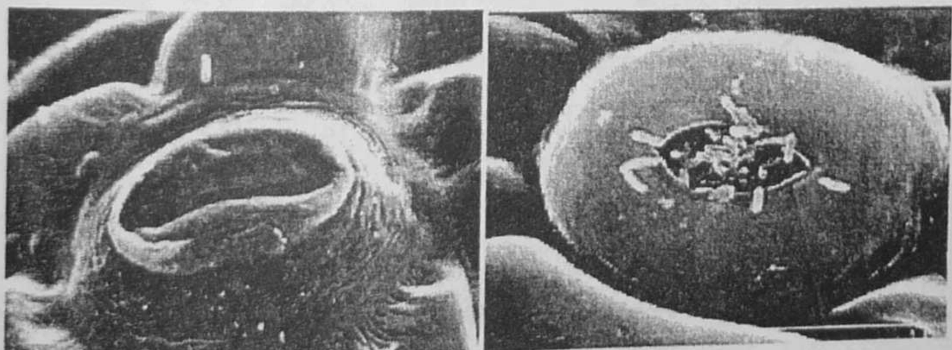
قد تصل نسبة التلوث فى مزارع الأنسجة إلى ١٠٠%، وبذلك يعد التلوث من أخطر العوامل التى لا تؤدى فقط إلى ارتفاع تكاليف الإنتاج بل إلى فقدان بعض التراكيب الوراثية التى قد يصعب الحصول عليها مرة أخرى أو يستغرق وقتاً طويلاً للحصول عليها. ولكى يستمر المُستأصَل النباتى فى الحياة والنمو فى القوارير لابد وأن يكون خالياً من الإصابة بالحشرات والفطريات ومعظم أنواع البكتيريا. ولذا يصبح من الأهمية القصوى المحافظة على المعمل بما يحتويه من أرضيات وحوائط وهواء خالياً من الأتربة والتلوث بالجراثيم المختلفة. ويتضح من النظر لتركيب وسط النمو المستعمل فى زراعة الأنسجة مدى صلاحيته لنمو العديد من الكائنات الحية الدقيقة لاحتوائه على العديد من العناصر المعدنية والعضوية لاسيما التركيز المرتفع من السكر المحفز لنمو تلك الكائنات. ويمكن ملاحظة النمو السريع لبعض هذه الملوثات وقضائها على المُستأصَل النباتى تحت الظروف المثلى للنمو خلال بضعة أيام من تأسيس المزرعة. وفى بعض الحالات يحدث نمو للملوثات داخل المُستأصَل النباتى وذلك باستهلاكه للمواد الغذائية وإفرازه لبعض المركبات السامة التى تدمر النسيج النباتى. وقد تتحول الملوثات السطحية epiphytic والتى يسهل قتلها إلى داخلية endophytic أثناء جمع وإعداد المُستأصَلات النباتية أو إعادة تقسيم المزرعة (Gunson & Spencer- Phillips, 1994) ومن ثم يتطلب الأمر استعمال بعض المركبات التى تقتل تلك الملوثات داخل الأنسجة أو على الأقل توقف نموها.

وهناك أربعة مصادر للتلوث فى مزارع الأنسجة، وهى المُستأصَل النباتى سواء كان التلوث به داخلياً أو سطحياً، والبيئة، والأدوات المستعملة فى فصل وزراعة المُستأصَل النباتى، وأخيراً عدم الدقة أثناء إعداد وزراعة المزرعة. وربما يعزى سرعة انتشار الملوثات الفطرية عموما و *Fusarium poe* على وجه التحديد إلى انتشار بعض

الحشرات كالنمل والتربس (Leifert & Cassells, 2001). وكقاعدة عامة يجب ملاحظة أن أى سطح أو جزء تم تعقيمه أثناء العمل يجب عدم تعريضه للتلوث مرة أخرى كأن يلمس باليد أو بتحريك شئ آخر غير معقم فوقه أو بإعاقة حركة الهواء المعقم داخل كابينة العمل مما يسمح للهواء غير المعقم بالدخول إلى جو الكابينة. وسوف يتم تناول كل عملية من عمليات التعقيم بالتفصيل فى الجزء التالى.

أولاً: تعقيم المُستأصَل النباتى

هناك العديد من الكائنات الحية الدقيقة التى تعيش على أسطح النبات ويمكن أن تتخلل أنسجته عن طريق الفتحات الطبيعية كالثغور (شكل رقم ٥-١) أو الجروح بطبيعة الحال. ويعتبر المُستأصَل النباتى من أهم مصادر التلوث فى زراعة الأنسجة خاصاً إذا كان النبات الأم ينمو فى حقل مفتوح. ومن ثم يجب أن يعقم سطحياً للتخلص من هذه المسببات المرضية قبل زراعته. ومن حسن الحظ أن العديد من الملوثات السطحية ومنها الخمائر والكثير من أنواع البكتيريا والميكوبلازما يمكن التخلص منها بسهولة فى عملية التعقيم السطحى إن لم تكن مغطاة تحت الشعيرات أو الزغب الموجود على السطح، لكن من الصعب التخلص من البكتيريا الموجبة لصبغة جرام بصورة تامة فى مزارع الإكثار الدقيق.



شكل ٥-١: يوضح الخلايا البكتيريا العصوية على سطح الورقة وداخل احد الثغور (http://www.youtube.com/watch?v=ZBcs0hvnXgI)

وأشار Leifert & Cassells (2001) إلى أن تركيز الأملاح ونوعيتها والرقم الهيدروجينى للبيئة من العوامل التى تسبب وقف نشاط العديد من تلك الكائنات. ومن المعروف أن درجة الحرارة فى غرف نمو مزارع الأنسجة اقل من ٢٥°م فى معظم الحالات. وتلك أقل بكثير من درجة الحرارة المثلى لنمو أغلب الكائنات الدقيقة والتى ربما تزيد فى الغالب عن ٣٥ °م. وتعتبر هذه المرحلة شدية الأهمية فإن لم يتم الكشف عن هذا التلوث بالطرق المعملية المعروفة فى علم الكائنات الدقيقة فسوف يستمر التلوث فى الانتقال من مزرعة إلى أخرى، وقد ينشط فى إحدى مراحل الإكثار الدقيق بسبب استعمال مكونات نمو وهرمونات مختلفة أو حتى بعد النقل للحقل Leifert & Cassells (2001). ولما كانت تلك الملوثات تحصل على احتياجاتها الغذائية من أنسجة النبات فإن الأنسجة المجروحة والتى تظهر عليها أعراض الشيخوخة أو تلك القريبة من غدد إفراز الرحيق تكون أكثر عرضة للتلوث (Preece, 1988)، ويجب تفادى أخذ المُستأصَلات النباتية من هذه الأجزاء أو إتباع طرق التعقيم السطحى التى تضمن خفض هذا التلوث بدرجة عالية مع استعمال بعض المضادات الحيوية للتغلب على الملوثات الداخلية. ويصاحب بقايا الحشرات على الأنسجة النباتية والأسمدة العضوية حمل ميكروبى عالى.

وتتوقف نسبة التلوث على نوع المُستأصَل النباتى فالأجزاء الأرضية كالأبصال والريزومات والكورمات أكثر عرضة للتلوث من الأجزاء الخضرية الغير ملامسة للتربة. كما أن لحجم المُستأصَل النباتى دوراً فى نسبه التلوث، فالقمم الميرستيمية غالباً خالية من معظم الملوثات على العكس من الأجزاء الأكبر حجماً. وعموماً الأنسجة المسنة يكون التلوث فيها أعلى من الحديثة وقد لاحظ Enjalric *et al.* (1988) انخفاض معدل التلوث فى القمم النامية لنبات Hevea بالمقارنة مع الأجزاء المسنة. لكن العديد من الكائنات الحية الدقيقة الموجودة خلال المسافات الخلوية قد لا تتأثر بالتعقيم السطحى وتستطيع النمو والانتقال بتقسيم المزرعة. وقد يلاحظ عودة بعض الكائنات الحية الدقيقة للنشاط فى المرحلة الرابعة من زراعة الأنسجة حيث تستخدم بيئة ذات تركيز منخفض

من الأملاح والسكر. ويوضح (2002) .Sessitsch *et al* قدرة التعقيم السطحى على التخلص من معظم الفطريات والبكتيريا إلا أن الفيروسات وكذلك الفيرويد تظل موجودة فى أنسجة النباتات وتنتقل عبر عملية الإكثار الدقيق فى حالة ما إذا كانت النباتات الأم مصابة. كذلك قد تحمل بذور بعض النباتات الفيرويد والبكتيريا والفطريات الداخلية إلا أنه من السهل معرفة التلوث الداخلى للبذور حيث سرعان ما تنبت الجراثيم بمجرد الزراعة فى البيئة.

وبالطبع يختلف معدل التلوث الميكروبى باختلاف مكان النمو والمناخ السائد، فالأفرع النامية فى جو رطب ودرجة حرارة عالية نسبياً تكون أكثر عرضة للتلوث عن تلك النامية فى جو جاف وحرارة منخفضة وبالتالى يتباين التلوث باختلاف فصول السنة (George, 1993). والمُستأصَل النباتى إما أن يكون مصدره نباتات نامية فى الحقل أو نباتات نامية فى بيوت محمية متحكم فى ظروفها الجوية. وفى الحالة الأولى تكون هناك فرصة كبيرة للتلوث إلا إذا كانت الأنسجة المستعملة مأخوذة من داخل أنسجة النبات وليس الأجزاء السطحية منه. فزراعة أجزاء من جذور الجزر أو درنات البطاطس على سبيل المثال تؤخذ من الجزء الداخلى بعد الغسيل الجيد والتقشير. وفى مقارنة لعدد الجراثيم الموجودة على أزهار الطماطم النامية فى حقل مفتوح، والبيت المحمى، وغرفة نمو وجد أن هذه الأعداد قبل التعقيم على التوالى هى ١٣٠٠٠٠٠، و٨٥٥٢٠، و ٩٠ أما بعد التعقيم فكانت الأعداد ٩٢٢٠٠٠، و١٦٠٠، و٤٣ على الترتيب. أما نسبة التلوث بعد الزراعة فكانت ١٠٠، و٦٠، و ٣٠% على التوالى (Pierik, 1987). وإن كان هناك ضرورة لاستخدام بعض النباتات الخشبية التى تنمو فى الحقل تؤخذ الأفرع حديثة التكوين ويراعى ما يلى:

- مقاومة الأمراض الفطرية والبكتيرية الداخلية باستخدام مبيدات جهازية، وقد يترتب على ذلك تأثر المُستأصَل المنزرع عقب تأسيس المزرعة (Kritzinger *et al.* 1997). وتساعد الرطوبة المنخفضة فى جو الصوبة وعدم ابتلال الأوراق بالماء على

الحد من التلوث، ومن الضرورى ترك النباتات ليجف الماء الموجود على السطح قبل أن تعقم وتستعمل للإكثار.

- تؤخذ البراعم بما عليها من أوراق حرشفية بعد انتهاء فترة السكون مباشرة وقبل تفتحها وتحفظ فى أكياس بولى إثيلين فى درجة حرارة منخفضة (٥ °م) حتى لا تجف إذا لم يتم استعمالها مباشرة.

- إذا كانت النباتات فى طور السكون يتم التعقيم السطحى للأفرع باستعمال الكحول لمدة خمس ثوانى ثم الكلوركس التجارى بتركيز ١٠-٢٠% لمدة ١٠ دقائق. توضع قواعد السيقان فى محلول ٢% سكر و ٢٠٠ ملجم/لتر من 8-hydroxyquinoline citrate وتحفظ على درجة حرارة ٢٣ °م. ويضاف للمحلول السابق ٥٠ ملجم/لتر من حامض الجبريلك لكسر السكون إذا كانت السيقان جمعت فى الخريف وقبل دخول الشتاء (Read, 1988)، وينصح بقطع حوالى ٢ سم من قاعدة الساق بعد يومين لتفادى انسداد الأوعية الناقلة. ثم تستعمل السيقان بعد تفتح ونمو البراعم.

- إن لم تكن النباتات فى طور السكون تؤخذ الأفرع قبل بدء تفتح البراعم وتوضع فى كأس به ماء فى المعمل ويؤخذ النمو الحديث المتكون عقب ذلك.

- للحد من معدل التلوث عند استخدام النباتات النامية فى الصوب الزجاجية يجب مراعاة الحفاظ على النباتات من الإصابة بالحشرات كالمن والتربس والعناكب لأنها مصادر لنقل العديد من الأمراض.

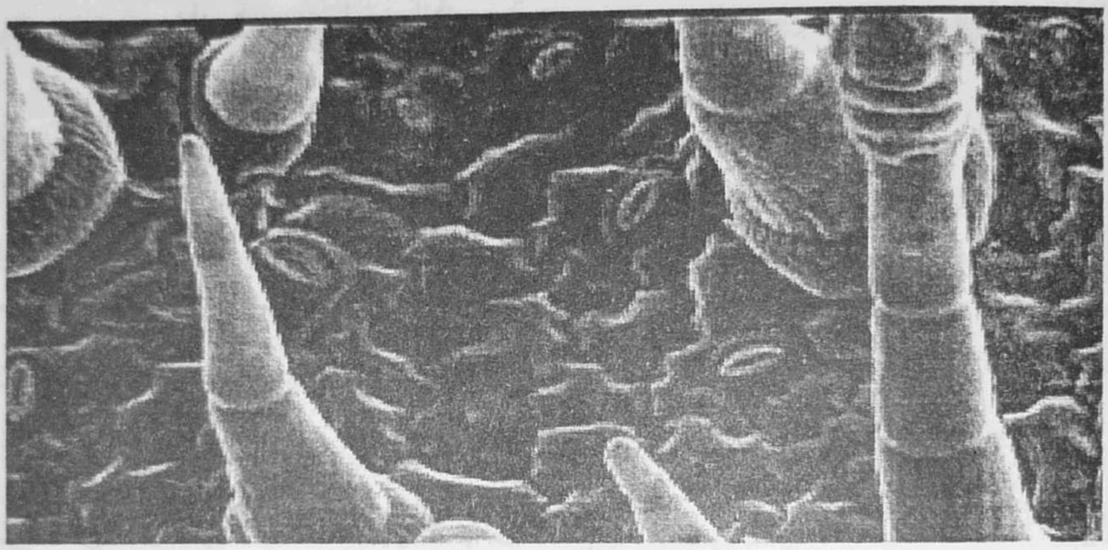
هذا وتوضح التجربة التى قام بها Watt *et al.* (2003) لنقل الأجزاء المنتخبة من أشجار الكافور إلى المعمل لتأسيس المزرعة أن الطرق المختلفة للنقل تؤثر على معدل التلوث الحادث فى هذه المرحلة، وبالتالى نجاح المزرعة. وكقاعدة عامة فإن الأجزاء الصلبة كالبذور والثمار يمكن تعقيمها بسهولة وبدون حدوث ضرر أما الأجزاء الغضة كالقمم النامية والبتلات فهى حساسة للتعقيم ويجب أن لا يؤدى التعقيم إلى موتها مع خفض المحتوى الميكروبى إلى أقل حد ممكن قبل نقلها للمعمل. أما الأجزاء الموجودة داخل تراكيب تحميها كالمبايض وهى غالباً خالية من التلوث السطحى، فيمكن تعقيم الأجزاء الخارجية ثم فصل المبايض وزراعتها مباشرة. ولما كانت البذور سهلة التعقيم فإنه يفضل ابتداء زراعة الأنسجة بتعقيم البذور سطحياً ثم زراعتها للحصول على

بادرات معقمة تستعمل للزراعة (Razdan, 2002). ويجب أن تكون المواد المستخدمة فى التعقيم السطحى رخيصة الثمن وغير سامة أو منخفضة السمية سواء للإنسان أوالنسيج النباتى وذات مدى واسع من التأثير على الميكروبات.

التعقيم السطحى

الهدف منه التخلص من الملوثات السطحية epiphytic دون تلك الموجودة داخل الأنسجة. وقبل التعقيم يجب إزالة أى أجزاء جافة أو بقايا التربة والأتربة ثم يغسل الجزء المستعمل خاصة لو كان من أجزاء أرضية كالجذور والدرنات والريزومات تحت ماء جارى. وفى هذه الحالة يمكن تقشير هذه الأجزاء والتخلص من الأجزاء الخارجية الأكثر عرضة للتلوث. ويلى ذلك غمر المُستأصَل النباتى فى كحول يتراوح تركيزه بين ٧٠ و ٩٠% على أساس نوع النسيج وذلك لعدة ثوان، يعتبر الإيثانول من أكثر الكحولات استعمالا لتعقيم الأنسجة النباتية سطحياً لكن من النادر استعماله بمفرده حيث يتم معاملة الأنسجة بعد غمرها فى الكحول بأحد المحاليل المطهرة. ويعمل الكحول بجانب قتله للميكروبات على إزالة الفقاعات الهوائية من على الأنسجة النباتية خاصة فى حالة وجود شعيرات أو زغب (شكل رقم ٥-٢) يغطى السطح الخارجى وبالتالى يعيق بشدة وصول المحلول إلى كامل السطح، كما يضمن زيادة فاعلية المحلول المعقم. ويشير (Tynan, 1994)إلى أن مشكلة إكثار نباتات *Banksia coccinea* تكمن فى صعوبة التعقيم السطحى حيث أوضحت صور المجهر الإلكترونى وجود الشعيرات التى تغطى السطح وكثير من الأجسام الغريبة بين تلك الشعيرات. وكانت بعض المعاملات باستخدام المبيدات الفطرية قبل فصل المُستأصَل النباتى ونقع الأجزاء النباتية فى محلول Benlate لمدة ١٢ ساعة فعالة فى التغلب على هذه المشكلة. وعموماً يتراوح زمن معاملة النسيج بالكحول من ٣٠-١٢٠ ثانية على أساس نوع النسيج فالأنسجة الغضة لا تتطلب سوى ٣٠-٦٠ ثانية أما الأنسجة المتخشبة والبذور فيمكن معاملتها بالكحول حتى ٥ دقائق. ويجب ألا تزيد مدة المعاملة بالكحول عن عدة ثوانى خاصة فى الأنسجة الخضراء حتى

لا تموت، يراعى عدم استعمال كحول تركيزه ٩٠% لأنه يذيب الطبقة الشمعية الخارجية وينزع الماء من الأنسجة مما يؤدى إلى موتها، وقد يلاحظ تغير لون الكحول سريعا نتيجة استخلاصه الكلوروفيل بمجرد إضافته. وبعد المعاملة بالكحول يتم معاملة النسيج بإحدى المواد المعقمة. ومن أكثر المواد استخداماً لهذا الغرض الصوديوم هيبوكلوريت، ونترات الفضة، وماء البروم، وفوق أكسيد الهيدروجين، وبرمنجانات البوتاسيوم (Ahloowalia *et al*., 2004). لكن من الناحية التطبيقية يتم المعاملة بإحدى الكيماويات الآتية:



شكل ٥-٢: الشعيرات التى توجد على سطح بعض الأوراق تعيق وصول محلول التعقيم إلى كامل النسيج (http://www.youtube.com/watch?v=ZBcs0hvnXgI).

١. الصوديوم هيبوكلوريت NaOCl

يعتبر الصوديوم هيبوكلوريت من أكثر المواد استعمالاً فى التعقيم السطحى. ويتراوح التركيز المستعمل منه ٢-٢.٥% وزن/حجم على حسب نوع النسيج النباتى وزمن التعقيم. وتستعمل أغلب المعامل محلول التبييض المعروف بالكلوركس والمستخدم فى غسيل الملابس لهذا الغرض. والتركيز المشار إليه فى معظم أبحاث زراعة الأنسجة يتراوح بين ٥ و٢٠% ، لكن يجب التأكد من فاعلية الكلوركس من حيث تركيز الكلور،

ويجب عدم استعمال العبوات بعد فتحها بفترة طويلة مع حفظها فى الثلاجة حتى لا يتطاير الكلور. ويعمل كل من حامض هيبوكلورس HOCl وOCl^- وهى الشق الفعال فى الكلوركس على قتل الميكروبات بالأكسدة ويعتبر الأول أكثر فاعلية من الثانى. ويفضل أن يكون الرقم الهيدروجينى لمحلول التعقيم ٦-٧. كما يمكن استعمال هيبوكلوريت الكالسيوم بتركيز ٣٥-١٠٠ جم/لتر، مع ترشيح المحلول قبل استعماله. كما يستعمل هيبوكلوريت الكالسيوم المحضر فى صورة أقراص بإضافة قرص لكل ١٠٠ مل ماء. ويفضل استعمال هيبوكلوريت كالسيوم بدلاً من صوديوم هيبوكلوريت فى حاله الأنسجة الحساسة للتعقيم لأنه أقل نفاذاً فى الأنسجة.

٢. كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$

ريطلق عليه محلول سليمانى وهو من المحاليل المعقمة لكنه شديد السمية للإنسان وشديد الضرر للأنسجة النباتية إذا زاد تركيزه عن اللازم. ولذا لا ينصح باستعماله إلا فى حالة عدم صلاحية المحاليل المعقمة الأخرى. وفى حالة استخدامه لابد أن تغسل الأجزاء المعقمة مرات أكثر بالماء المقطر بالمقارنة مع المحاليل الأخرى حيث أن ترك أى آثار من هذه المحاليل قد يقتل النسيج.

ولزيادة كفاءة محلول التعقيم يفضل إضافة ٥-٧ نقاط من محلول Tween 20 لكل لتر منه، أو يستعمل بضع نقاط من الصابون السائل إن لم تتوفر المادة الناشرة المشار إليها لخفض التوتر السطحى للمحلول فيزيد التصاقه بالنسيج. كذلك يمكن إجراء التعقيم تحت تفريغ جزئى لضمان طرد فقاعات الهواء التى قد توجد مع الأنسجة المراد تعقيمها. لكن التفريغ الشديد ربما يعمل على دخول المحلول إلى داخل النسيج مما يؤدى إلى موته. ويجب تقليب المحلول والأنسجة باستمرار أثناء التعقيم لضمان التلامس التام. ولمنع دخول المحلول المعقم إلى داخل أوعيه الخشب، يغمس طرف الساق أو أعناق الأوراق على سبيل المثال فى شمع سائل قبل إجراء التعقيم مع ملاحظة إزالة هذا الجزء

عند الزراعة. ومن الضرورى معاملة النسيج بالمحلول المعقم لفترة زمنية مناسبة فزيادتها تسبب ضرر للنسيج ويلاحظ ذلك بتغير لون النسيج إلى الأبيض أو البنى، لذا تقطع هذه الأجزاء عند الزراعة.

وكان لسمك الطبقة الشمعية والشعيرات على أسطح نباتات *Banksia coccinea* دوراً فى صعوبة التعقيم السطحي، وللتغلب على ذلك قام Godfrey & Cross (2005) بوضع السيقان بعد فصل الأوراق فى محلول تركيزه ٠.٠١ مولر من حامض الهيدروكلوريك وبضع قطرات من Tween 80 بحيث كان الرقم الهيدروجينى ٢.٤ مع الرج لمدة ثلاثة دقائق. وبعد ذلك تم التعقيم السطحى بالصوديوم هيبوكلوريت لمدة ١٠ دقائق ثم نقلت المُستأصَلات إلى محلول معقم من حامض الستريك بتركيز ٢.٤ مليمول ورقم هيدروجينى ٢.٩ لمدة ٥ دقائق قبل الزراعة. وكان من شأن تلك المعاملات خفض معدل التلوث حيث قل عدد الشعيرات على السطح مع زيادة فى نعومة السطح بازالة الكثير من الزوائد الشمعية والأجسام الغريبة من سطح المُستأصَلات.

ويجب أن يؤخذ فى الاعتبار تركيز المادة المعقمة وارتباطه بزمن التعقيم حيث يزيد الزمن اللازم للتعقيم عند استعمال تركيز منخفض من المادة المعقمة إذا كان النسيج حساساً للمحلول. وجدير بالذكر أن التركيز العالى ولمدة قصيرة يكون أكثر كفاءة فى التعقيم من المحلول المخفف ولمدة طويلة. ولإعطاء فكرة عن تباين زمن التعقيم باختلاف نوع المُستأصَل النباتى يوضح Pierik (1987) أن أنسب زمن للتعقيم باستعمال ١٠% صوديوم هيبوكلوريت هو ٤٥ دقيقة بالنسبة لأوراق نبات *Strelitiza regina*، أما أوراق *Anthurium andreanum* وبذور *Tulipa gesneriana* فتعقم لمدة ٣٠ دقيقة، والبراعم الزهرية لنباتات الفيرزيا لمدة ٢٠ دقيقة، والأوراق العصارية من *Hyacinthus* والأعناق الورقية لنبات *Gerbera* ١٥ دقيقة، ويقل الزمن إلى ٥ دقائق فقط لقمم أفرع نباتات *Nephrolepis*. ويوضح جدول (رقم ٥-١) مقارنة بين بعض مواد التعقيم السطحى المستعملة فى زراعة الأنسجة.

جدول ٥-١: مقارنة بين بعض المواد المستخدمة فى التعقيم السطحى للأجزاء النباتية المنزرعة (Razdan, 2002).

مادة التعقيم	التركيز المستعمل	سهولة غسلها	زمن المعاملة دقيقة	درجة التأثير
صوديوم هيبوكلوريت	١-١٤%*	+++	٥-٣٠	شديد التأثير
كالسيوم هيبوكلوريت	٩-١٠%*	+++	٥-٣٠	شديد التأثير
فوق أكسيد الهيدروجين	١٠-١٢%	+++++	٥-١٥	مؤثر
ماء البروم	١-٢%	+++	٢-١٠	شديد التأثير
نترات الفضة	١%	+	٥-٣٠	مؤثر
كلوريد الزنبقيك	٠.٠١-١%	+	٢-١٠	شديد التأثير
المضادات الحيوية	٤.٥٠ ملجم/لتر	++	٣٠-٦٠	مؤثر

*غالباً يستعمل ٢٠% حجم/حجم من المحلول التجارى

ومن الجدير بالذكر الإشارة إلى أن معظم التلوث الحادث فى مزارع الأنسجة يرجع إلى وجود أنواع من البكتريا التى لا تمثل مشكلة للنباتات العادية لكنها تنشط تحت ظروف الزراعة المعملية (Leifert & Cassells, 2001). وكما سبقت الإشارة يلاحظ أن عملية التعقيم السطحى لا تزيل كل التلوث الحادث من الميكروبات المختلفة، لكن لا بد وأن يضمن التعقيم السطحى قتل الغالبية العظمى من الميكروبات السطحية. ويجب التأكد من خلو المزرعة من التلوث فى نهاية مرحلة التأسيس، لكن لسوء الحظ ليس هناك طريقة سهلة لمعرفة ما إذا كان النسيج ملوثاً أم لا قبل زراعته. لكن من الممكن تحديد التلوث فى فترة وجيزة لا تتجاوز عدة أيام بشق المُستأصَل النباتى طولياً إن كان ساق أو جذر وزراعته فى عدد من البيئات المحتوية على مستخلص الخميرة أو الببتون والتى

تشجع نمو الميكروبات المختلفة مع التحضين على درجة حرارة مرتفعة نسبياً عن تلك الموصى بها فى مزارع الأنسجة. ولما كانت النباتات الناتجة من الزراعة المعملية خالية نظرياً من الكائنات الحية الدقيقة فإنه يجب العمل على تنشيط العلاقة التكافلية بين بعض الأنواع النباتية والكائنات الدقيقة مثل Mycorrhiza و Rhizobium عند نقل النباتات إلى الحقل بتلقيح الجذور لضمان النمو الجيد بالحقل وسيوضح ذلك لاحقاً.

التلوث الداخلى للمستأصل النباتى

ليس للنباتات جهاز مناعى كالحيوانات يحميها من مهاجمة الميكروبات كما أن عملية التعقيم السطحى تقضى على التلوث الخارجى فقط. أما التلوث الذى ينشأ عن وجود البكتيريا داخل الأنسجة فى المسافات البينية بين الخلايا أو داخل الحزم الوعائية فلا يتأثر بهذه المعاملات. ويطلق على هذا النوع من البكتيريا Endophytic وربما يظل التلوث كامناً إلى أن يتم تقسيم المُستأصَل النباتى وملامسة الكائنات الدقيقة أو جراثيمها للبيئة. وغالباً يكون التلوث الداخلى راجعاً للبكتريا العصوية التابعة لجنس *Bacillus* أو من بعض الفطريات الجهازية. ويؤدى وجود الكائنات الدقيقة فى المزرعة إلى موتها أو تثبيط النمو كما سجلت بعض التغيرات فى قدرة بعض الأنسجة على النمو والتكشف وتكوين أفرع جانبيه. لكن فى بعض الحالات لا يسبب وجود بعض أنواع البكتريا داخل النسيج أى مشكلة فى زراعة الأنسجة فبكتريا *Pseudomonas* التى تلوث القمم النامية لنبات الباباظ لا تسبب أى ضرر عند زراعة هذه القمم. لكن بتكرار أخذ أجزاء نباتية منها وزراعتها لمدة ١٣ مزرعة يحدث بطء فى نمو المزرعة (Pious *et al.*, 2007) وللتغلب على التلوث الداخلى تزرع القمم النامية دون باقى الأجزاء النباتية لأنها غالباً خالية من التلوث ثم يستخدم النمو الناتج بعدها فى الزراعة، أو يتم إضافة بعض المضادات الحيوية إلى بيئة النمو. ونظراً لتخصص المضادات الحيوية يفضل إضافة أكثر من مضاد حيوى واحد للتغلب على الصور المختلفة من التلوث الداخلى. ومن حسن الحظ أن التلوث

الداخلى ليس شائع فى النباتات الناتجة من مزارع الأنسجة ويمكن التغلب على بعضه بسهولة فالقمة النامية لنبات *Pelargonium* بطول ١مم وليس القمم النامية للأفرع الجانبية خالية من التلوث والذى يوجد غالباً فى أسفل الساق وبتكرار أخذ القمة النامية من المزرعة لمدة دورتين يمكن الحصول على نموات خالية من التلوث.

استخدام المضادات الحيوية

يعتبر الموت الموضعى لأطراف أوراق نباتات *Limonium cordatum* الناتجة من مزارع الأنسجة من المشاكل الشائعة فى الإكثار التجارى لهذا النبات والذى يتم باستعمال الأعناق الزهرية كمستأصل نباتى. وقد عزل Liu *et al.* (2005) عدة أجناس من البكتيريا مثل *Pasteurella multocida* و *Stenotrophomonas maltophilia* و *Alcaligenes* sp من الأعناق الزهرية لهذا النبات. واستطاع التخلص من هذه البكتيريا وبالتالى نمو النباتات طبيعياً فى الحقل إما باستعمال نباتات خالية من الإصابة أو باستعمال بعض المضادات الحيوية مثل إضافة augmentin أو cefotaxime أو خليط منهما إلى البيئة المستعملة للإكثار. والمضادات الحيوية هى مواد طبيعية تخلق بواسطة الكائنات الدقيقة أو تصنع معملياً ولها القدرة على وقف أو تثبيط نمو ميكروبات أخرى. ونظرياً يمكن إزالة التلوث من مزارع الأنسجة بإضافة واحد أو أكثر من المضادات الحيوية حيث يبين Keskitalo *et al.* (1998) أن القضاء على التلوث الداخلى فى المُستأصَلات النباتية لنبات *Tanacetum vulgare* تطلب استعمال أكثر من مضاد حيوى واحد، لكن كان لاستعمال كلا من rifampicin وgentamicin حتى بتركيزات منخفضة تأثير واضح فى وقف نمو معظم أنواع التلوث التى عزلت من هذا النبات. بينما ثُبط نمو الأنواع التابعة لعائلة Enterobacteriaceae باستعمال cefotaxime وعند استعماله مع gentamicin أمكن تثبيط جميع أنواع البكتيريا تقريباً. لكن يؤكد Pierik (1987) أن استعمال المضادات الحيوية لا يضمن تماماً القضاء على التلوث الداخلى فقد يظل كامناً

دون أن يلاحظ بالعين المجردة لمدة قد تصل إلى عدة سنوات كما أشار Abreu-Tarazi *et al.* (2009) فى مزرعة للاناناس. ثم ينشط النمو بعد فترة من الزراعة أو عقب نقل النباتات للحقل.

ويمكن بالطرق المعملية أو الجزيئية التحقق من وجود التلوث. فعلى سبيل المثال فى حالة استعمال مركب carbenicillin للتخلص من بكتريا Agrobacterium التى تستعمل بهدف نقل الجينات إلى الخلايا فى مزارع الأنسجة حيث لوحظ نشاط البكتريا بعد عدة مرات من إعادة الزراعة إن لم يضاف المضاد الحيوى للبيئة. لكن أشار Sedlak *et al.* (2008) إلى إمكانية التخلص من التلوث ببكتريا *Xanthomonas* sp. و *Bacillus* sp لمستأصلات نباتات *Prunus avium* بإضافة ٢٠٠ ملجم/لتر من cefotaxime sodium لمزارع تكشف الأشطاء مرة واحدة. أما Thomas & Prakash (2004) فقد تمكنا من الحصول على ٧٥ % من اشطاء العنب التى تكشفت من زراعة القمم النامية فى أنابيب زراعة ١٥٠ X ٢٥ مم بإضافة ١ مل من محلول gentamycin أو cefazolin أو خليط منهما بتركيز ٥٠ ملجم/لتر فوق سطح البيئة.

لكن لا بد أن يؤخذ فى الاعتبار أن إضافة المضادات الحيوية ليس بديلا عن التعقيم السطحى والاحتياطيات العامة للحد من التلوث. كذلك فإن لبعض المضادات الحيوية تأثير مثبط أو سام على نمو النباتات أو التكشف. فعلى سبيل المثال عند تجديد زراعة القمم النامية لنباتات *Pelargonium* x *hederaefolium* لعدة سنوات لاحظ Wojtania *et al.* (2005) حدوث تلوث ببكتيريا *Paenibacillus glycanilyticus* و *Lactobacillus paracasei*. وللتغلب على هذا قام باستعمال عدة أنواع من المضادات الحيوية، فوجد أن استعمال كلا من neomycin و streptomycin سببا سمية للنباتات. لكن أمكن تثبيط نمو البكتيريا بدرجة كبيرة مع تكوين أشطاء ذات جودة عالية بعد ثلاث مرات من نقل المزرعة إلى بيئة مضاف إليها carbenicillin بتركيز ٥٠٠ ملجم/لتر

لبيئة. وقد كان لاستعمال cefotaxime بتركيز ٢٥٠ ملجم/لتر تأثير مشابه لتثبيط نمو البكتيريا لكن سبب تقزم للسيقان واصفرار الأوراق وباستمرار الزراعة فى تلك البيئة ماتت النباتات. وتستعملالمضادات الحيوية بصور مختلفة كأن تضاف للبيئة أو يغمس فيها المُستأصَل النباتى قبل زراعته، أو رش النباتات الأم قبل أخذ الأنسجة لزراعتها، وأحسن نتائج للحد من التلوث عندما يغمر الجزء المنزرع فى المضاد الحيوى وزراعته فى بيئة تحتوى عليه. وقد حدد Pierik (1987) الشروط التى يجب توفرها فى المضادات الحيوية المستعملة فى مزارع الأنسجة فيما يلي:

١. تذوب فى الماء.
٢. ثابتة وغير متأثرة بالرقم الهيدروجينى أو مكونات البيئة.
٣. ليس لها تأثير على مكونات البيئة أو المزرعة.
٤. لها مدى واسع من التأثير.
٥. قاتلة للميكروب وليست مثبطة لنموها.
٦. جهازيه الحركة فى عصارة النبات.
٧. تضمن طريقة عملها عدم تطوير مناعة الميكروب ضدها.
٨. رخيصة الثمن.

لكن من الناحية التطبيقية يصعب إيجاد مركب يفى بكل هذه الشروط فمعظم المواد المستعملة تكون مثبطة للنمو. ويلاحظ أن معظم هذه المركبات تتكسر بالحرارة ومن ثم يجب تعقيمها بالترشيح خلال مرشحات قطر ثقوبها ٠.٤٥ ميكروميتر والتى لا تسمح بمرور الميكروبات ويستقبل المحلول فى إناء معقم ثم يضاف للبيئة. ومن المضادات الحيوية المستخدمة فى زراعة الأنسجة carbenicillin و ampicillin و cefatoxime kanamycin و chloromycine و penicillen-G و streptomycin و rifamyici ويعيق استعمال الكثير منها أثرها الضار على النمو والتكشف كذلك أثرها

على الإنسان. ويتباين أثرالمضادات الحيوية على الأنسجة على حسب النوع النباتى والنسيج فقد لوحظ عدم نمو الأوراق الفلقية والقمم النامية لنبات *Brassica juneea* عند زراعتها فى بيئة تحتوى على ٢٠ :٥٠ مليمول من Kanamycin بينما يمكن للبادرات النمو فى بيئة تحتوى على تركيز يصل إلى ٢٠٠٠ ميكروجرام. ويرجع التأثير المثبط للمضادات الحيوية إلى تأثيرها على البلاستيدات والميتاكوندريا وتخليق الكلوروفيل(Weide *et al.*, 1988). وقد يؤدى طول مدة زراعة الخلايا فى بيئة محتوية على المضادات الحيوية إلى نمو خلايا مقاومة لهذا التركيز من المضادات الحيوية (Bhau& Wakhlu, 2001) إما عن طريق الطفرات أو بالانتخاب لتلك الجينات المتخصصة بالسيتوبلازم.

ويتباين تأثير المضادات الحيوية على مزارع الأنسجة والذى يتأثر بالطرز الوراثى للنبات. ففى نباتات *Tanacetum vulgare* على سبيل المثال وجد Keskitalo *et al.* (1998) أن سرعة تكشف الأشطاء زادت من ٨.٣ يوم إلى ١٩ و ٢٠.٥ و ٢٢.١ يوم عند استعمال gentamicin و rifampicin و cefotaxime على التوالى لوقف التلوث بالمزرعة، وقد زادت هذه المدة بزيادة التركيز. وقد أنخفض عدد الأشطاء التى تكشفت خطيا مع زيادة تركيز تلك المركبات الثلاث من ٧.٨ إلى ٢.٠، و ٢.٣، و ٢.٢ نبات/مستأصل على التوالى. وقد انخفض طول الأشطاء ومعدل النمو بشدة باستعمال منظمات النمو حيث انخفض معدل النمو من ٤٤.٨ إلى ٩.٥ بإستعمال gentamicin. ولم تتكون الأجنة الجسدية فى مزارع الباباظ عند استعمال Kanamycin بتركيز ٢٠-٢٠٠ ملجم/لتر أو geneticin بتركيز ١٢.٥-٥٠ ملجم/لتر (Yu *et al.*, 2003). كما أثرت المضادات الحيوية المستعملة سلبياً على تكوين ونمو الجذور.

لكن أشار البعض إلى تشجيع بعض أنواع المضادات الحيوية للنمو والتكشف فى بعض أنواع الأنسجة المنزرعة. لكن لا تزال ميكانيكية هذا التنشيط غير معروفة بشكل

تام فقد وجد أن penicillens وكذلك carbenicillin يؤديان إلى تشجيع نمو خلايا *Bouvardia ternifolia* لأنهما يحتويان على سلسلة جانبية لها القدرة على تكوين مشتقات لبعض الأوكسينات بالتحلل المائى (Robert *et al*., 1989). ومن الأمثلة الأخرى للتأثير المنشط لبعض المضادات الحيوية فى الأنسجة المنزرعة مركب bacitracin الذى أدى إلى تنشيط نمو الكالوس الناتج من نبات *Catharanthus roseus* وشجع استعمال timentin تكشف الأشطاء من الأوراق الفلقية لبعض أصناف الطماطم (Costa *et al*., 2000). كما أن الجرعات المناسبة من Kanamycin تنشط تكشف بروتوبلاست الدخان لكن التركيز العالى نسبياً يعمل على عدم تخليق الكلوروفيل فى الأوراق. كذلك أدى Carbenicillin بتركيز ٦٠ ميكروجرام إلى زيادة عدد الكالوسات التى تكشفت عنها أجنة من نبات الدخان. وقد شجع إضافة Cefatoxime بتركيز ١٠٠ ميكروجرام تكوين أجنة جسدية من الزيجوت غير الناضج للقمح. ولا بد أن يوضع فى الاعتبار عند استخدام أحد المضادات الحيوية للتحكم فى التلوث فى مزارع الأنسجة التركيز اللازم لتثبيط التلوث والتأثير السام على النبات، فمثلاً المركب الذى يقتل البكتريا بتركيز ٥٠ ميكروجرام/لتر ويسبب سمية للنبات بتركيز ١٠٠ ميكروجرام يستعمل بأمان فى زراعة أنسجة هذا النبات. لكن لا يستخدم هذا المركب إذا تساوى التركيز القاتل للبكتيريا مع التركيز السام للنبات.

كثيراً ما تسبب الفطريات الملوثة للأنسجة الداخلية مشكلة فى مزارع الأنسجة. ورغم إشارة Shields *et al.* (1984) المبكرة إلى استعمال مضادات الفطريات mycotoxicity فى مزارع الأنسجة إلا أن الأبحاث المنشورة فى هذا المجال تؤكد أن استعمالها مازال محدوداً. ومن المركبات التى تستعمل لهذا الغرض المبيد الفطري Benomyl والذى يتكسر أثناء التعقيم، لكن المركب الناتج يكون له تأثير مثبط للفطر وقد يكون له تأثير مشابه للسيتوكينينات (West & Preece, 2006). ولكى تستعمل مضادات الفطريات فى الإكثار الدقيق لا بد وأن تفى بنفس الشروط التى سبق

الإشارة إليها فى الحديث عن المضادات الحيوية. ومعظم هذه الشروط يتوفر فى مركبات ergosterol biosynthetic inhibitors (EBIs) شائعة الاستعمال فى الزراعة والطب. ومن بين العديد من المركبات التابعة لهذه المجموعة يرى Tynan *et al.* (1993) أن مركب miconazole جدير بالدراسة والاستعمال فى الإكثار الدقيق نظراً لتأثيره الواسع على العديد من الفطريات وبعض أنواع البكتيريا الموجبة لصبغة جرام، وعدم تأثيره على العديد من النباتات فى مزارع الأنسجة. وفى بعض الحالات ينصح برش النباتات فى الحقل بأحد مضادات نمو الفطريات مثل Funguran بتركيز ١ جم/لتر (Prathanturarug *et al.*, 2007)، أو غمر المُستأصَلات فى محلول Benomyl بتركيز ٢جم/لتر لمدة أربع ساعات ثم غسل المُستأصَلات بماء عدة مرات قبل التعقيم السطحى التقليدى Mederos-Molina(2008).

وللتغلب على مشكلة التلوث بالبكتيريا والفطريات والتى وصلت إلى ١٠٠% فى مرحلة تأسيس مزرعة نباتات *Guadua angustifolia* قام Jimenez *et al.* (2006) برش النباتات فى الحقل أو البيت المحمى أسبوعيا ولمدة ستة شهور أثناء موسم الأمطار وكل شهر من باقى شهور السنة بمحلول من Kilol L DF-100 بتركيز ٥ مل/لترو Agri-mycin بتركيز ٢جم/لتر أو Benomyl بنفس التركيز. كما استعمل المبيد الحشرى Ambush 10 EC بتركيز ١ مل/لتر عند الضرورة. وقبل التعقيم تم غمر العقد الساقية فى محلول قلوى ٠.٠٥ وزن/حجم من المبيد الفطرى Extran MA 01 لمدة ١٠ دقائق أو خليط منه مع Agri-mycin و Benomyl بتركيز ٢جم/لتر لكل منهما لنفس الزمن. ثم تم التعقيم السطحى باستعمال الصوديوم هيبوكلوريت.

وتوضح النتائج المبينة فى جدول رقم (٥-٢) نجاح هذه المعاملات فى خفض معدل التلوث خاصة عند استعمال مستأصلات من البيت المحمى. أما إضافة ٢ جم/ لتر من الخليط المعروف بـ Plant Preservative Mixture (PPM) وهو مركب تجارى

للتغلب على التلوث فى مزارع الأنسجة من إنتاج شركة Plant Cell Technology, Washington DC, USA فقد كانت ناجحة لخفض التلوث بشكل فعال. قارن Watt *et al.* (2003) بين إضافة الكالسيوم هيبوكلوريت أو ٠.٥-١جم/لتر من Benomyl إلى بيئة الإكثار الدقيق للكافور فى مرحلة التأسيس فقط ولمدة أربع أسابيع. وتوضح النتائج المدونة فى جدول رقم (٥-٣) تأثير استعمال المبيد الفطرى أو الكالسيوم هيبوكلوريت فى خفض نسبة التلوث وزيادة نسبة تفتح البراعم وعدد الأفرع المتكشفة. لكن لاحظ Mohamed (2000) أن استعمال Benomyl بتركيز ٢جم/لتر قد سبب ضرر كبير فى انبات بذور ونمو بادرات *Tagetes erecta*.

ثانياً: تعقيم غرفة النمو والأدوات والزجاجيات

لتفادى التلوث فى غرفتى الزراعة والنمو ينصح بغسيل الأرضيات والجدران بالمطهرات المنزلية المعروفة ثم مسحها بمحلول صوديوم هيبوكلوريت ٢% أو بالكلوركس كإجراء أسبوعى. كذلك تستعمل الأشعة فوق البنفسجية لتعقيم غرف الزراعة ليلاً وملاحظة أن هذه الأشعة ضارة للعينيين. وتعقم الأدوات المعدنية كالملاقط والمشارط قبل الاستعمال تعقيماً جافاً فى فرن التعقيم على ١٨٠°م لمدة ساعتين بعد لفها فى ورق ألومونيوم. ولتفادى انتقال التلوث من نسيج لأخر أثناء العمل يتم تكرار تعقيم الأدوات المستخدمة، ويتوقف ضرورة تكرار ذلك على مدى التلوث الملحوظ فى التجارب المماثلة وكفاءة القائم بالعمل. ويتم ذلك بغمرها فى كحول ثم وضعها فى اللهب وتترك حتى تبرد ثم تستخدم مباشرة. ويجب التنويه إلى أنه عند وضع المشرط فى اللهب لا يترك حتى يحمر لونه لأن ذلك يؤدى إلى فقدان حدته بسرعة محدثاً جروح أكثر بالنسيج علاوة على إعاقة العمل. ويجب استبدال الكحول من فترة لأخرى لأن تركيزه يقل باستمرار كذلك يجب مراعاة عدم تراكم الأجزاء النباتية والبيئة به.

جدول ٥-٢: تأثير المعاملة الأولية بالمبيدات الفطرية والمضادات الحيوية وإضافة مركب PPM على معدل التلوث بعد ٨ أسابيع من تأسيس مزرعة *Guadua angustifolia* كما وجدها Jimenez *et al.* (2006).

مصدر المستأصلات	المعاملة الأولية	PPM* مل/لتر	التلوث %
الحقل	---	صفر	٩٤
	Extran	صفر	٨٨
	Benomyl + Agri-mycin + Extran	صفر	٧٦
	Benomyl + Agri-mycin + Extran	٠.٥	٦٧
	Benomyl + Agri-mycin + Extran	٢	٥٢
البيت المحمى	Benomyl + Agri-mycin + Extran	صفر	٥٨
	Benomyl + Agri-mycin + Extran	٠.٥	٦٣
	Benomyl + Agri-mycin + Extran	٢	١١

* Plant Preservative Mixture مركب تجارى من إنتاج شركة Plant Cell Technology, Washington DC, USA

جدول ٥-٣: تأثير إضافة الكالسيوم هيبوكلوريت أو Benomyl إلى بيئة النمو على نسبة التلوث وتفتح البراعم وعدد الأفرع المتكشفة من نباتات *Eucalyptus grandis* كما سجلها Watt *et al.* (2003).

المُستأصلات	تخزين	المعاملة (جم/لتر)		مرحلة تفتح البرعم			مرحلة الإكثار	
				% للتلوث	% لتفتح البراعم	% للتلوث	عدد الأفرع/مستاصل	عدد الأفرع/مستأصل
		مقارنة	٠	١٠٠	-	-	-	-
	أكياس بولى إثيلين	Benomyl	٠.٥	٢٠	٣١	٤٤	١١	٣.٥٤
			١.٠	٦.٧	٦٢	٢١	١٥	٦.٨٧
		CaOCl	٠.٥	١٣	٤٤	٣٨	١٦	٣.٧٧
			١.٠	٢٠	٣٣	٢٢	٢٤	٤.٨٠
معقم ومبلل بالماء	فيرموكيوليت	مقارنة	٠	٨٧	-	-	-	-
		Benomyl	٠.٥	٧٣	٢٠	١٠٠	-	-
			١.٠	٣٣	٤٤	٣٣	١٣	٤.٥٥
		CaOCl	٠.٥	٠	٦٧	٦٦	٢١	٤.٨٣
			١.٠	٠	٦٧	٥٣	٣٠	٩.٣٠

وتوجد بعض الأجهزة الكهربائية الحديثة مثل Bacti-cinerator تستخدم فى تعقيم الأدوات المعدنية أثناء العمل والتى تعتمد على وضع تلك الأدوات لمدة ٥ ثوانى فى كاس مملوء بكرات زجاجية ذات درجة حرارة عالية ٥٢٥°م. ومن مميزات هذا الجهاز هو تقليل خطر الحريق ومنع أو تقليل تكوين غاز الإيثيلين الذى يؤثر على المزرعة. كذلك يجب مراعاة عدم ترك الأدوات المعدنية فى كحول ٧٠% بعد الانتهاء من العمل حتى لا تصدأ.

ثالثاً: تعقيم البيئة

كما هو معروف تحتوى البيئة المستعملة فى مزارع الأنسجة على العناصر الغذائية اللازمة للنمو بالإضافة إلى تركيز مرتفع من السكر، لذا فإنها وسط جيد لنمو الكثير من الكائنات الدقيقة. ومن ثم تعقم البيئة فى الاوتوكلاف بعد تحضيرها مباشرة وقبل توزيعها فى أوعية الزراعة أو تعقم كلها ثم توزع فى الأوعية. وغالباً يتم التعقيم على درجة ١٢١°م وضغط ١.٥ كجم/سم٢ لمدة ١٥ دقيقة ومن الضرورى أن يطرد الهواء من الاتوكلاف عند بدء عملية التعقيم لأن الحرارة تنتقل فى البخار أسرع من الهواء. ويختلف الوقت اللازم لوصول البيئة إلى درجة حرارة التعقيم باختلاف حجم البيئة ويوضح جدول رقم (٥-٤) الوقت اللازم لتعقيم أحجام مختلفة من البيئة.

جدول ٥-٤: الزمن اللازم لتعقيم أحجام مختلفة من البيئة على درجة ١٢١°م (Pierik, 1987).

حجم البيئة (مل)								
٤٠٠٠	٣٠٠٠	٢٠٠٠	١٠٠٠	٥٠٠	٢٥٠	١٠٠	٥٠	٢٥
زمن التعقيم (دقيقة)								
٦٣	٥٥	٤٨	٤٠	٣٥	٣١.٥	٢٨.٥	٢٦	٢٤

ويلاحظ أن الحجم الأكبر من البيئة يتطلب زمن تعقيم أطول وذلك لطول الزمن اللازم لوصول درجة الحرارة فى وسط الوعاء المحتوى على البيئة إلى درجة الحرارة

المطلوبة. ويكون التلوث البكتيرى والفطرى واضحاً على سطح البيئة شبه الصلبة والأنسجة النباتية أو قد تظهر أعراض الإصابة بالكائنات الدقيقة فى شكل بقع لونها بنى على الأوراق أو السوق. أما فى حاله المزارع السائلة فإن التلوث يظهر على شكل عكارة إذا كان التلوث بكتيرى أما التلوث الفطرى فيتضح فى وجود كرات من الفطر. وقد تلوث البيئة والزجاجيات ببعض المواد الطيارة إذا كانت بعض الأدوات أو البيئة مغلفة بورق عادى كذلك فإن الأغطية البلاستيكية ينتج عنها غاز الإثيلين الذى يذوب فى البيئة وقد يثبط النمو.

تتكسر بعض المواد العضوية كالأحماض الأمينية، الفيتامينات، منظمات النمو، اليوريا جزئيا أو كلياً عند تعقيمها خاصة عند وجودها مع بعض المكونات الأخرى فى البيئة. وتزيد حساسية هذه المواد للحرارة بارتفاع درجة الحرارة وزيادة فترة التعقيم. ومن ثم يفضل تعقيم الأحجام الكبيرة من البيئة فى عبوات صغيرة حتى لا نضطر لإطالة فترة التعقيم. وفى معظم الحالات يمكن تعقيم المواد الحساسة جزئيا للحرارة مع باقى مكونات البيئة بشرط ألا تزيد مدة التعقيم عن ١٥-٢٠ دقيقه، أما المواد شديدة الحساسية للحرارة فإنها تعقم بالترشيح وتضاف للبيئة بعد التعقيم وقبل صبها فى أوعيه الزراعة مباشرة. ويوضح جدول رقم (٥-٥) بعض مكونات البيئة ومدى حساسيتها للحرارة كما أوضحها George (1993). فعلى سبيل المثال السكر وبعض السكريات الثنائية والثلاثية تتحلل مائيا عند تعقيمها فى وسط حامضى فيتحلل السكر إلى فركتوز وجلوكوز وعموما ليس هناك تأثير ضار لهذا التحلل.

وقد تحدث عملية كرمله للسكريات وتتكون بعض الأحماض من السكريات الأحادية بفعل التعقيم، وبذلك ينخفض الرقم الهيدروجينى ولا يتصلب الآجار. وقد أنخفض الرقم الهيدروجينى عند تعقيم بيئة MS المضاف إليها ٣٠ جم/لتر من الفركتوز أو المالتوز عند التعقيم لمدة ٢٠ دقيقة ودرجة حرارة ١٢١°م. وبخفض زمن التعقيم إلى

١٣ دقيقة وفتح جهاز التعقيم فور انخفاض الضغط إلى الضغط الجوى تصلب الآجار ولم يلاحظ تلوث فى المزرعة. وتزيد عمليات التحلل المائى، والكرمله، وتكوين الأحماض. عند تعقيم السكر مع باقى مكونات البيئة عن تعقيم السكر فى محلول مائى دون باقى مكونات البيئة وعموما ليس هناك ضرر كبير ينتج عند تعقيم السكر مع البيئة إلا إذا كانت

جدول ٥-٥: تأثيرحرارة التعقيم على بعض مكونات البيئة (George, 1993).

درجة التأثير بالحرارة	المركب
ضعيف	GA_3, IAA-L-alanine, IAA-glycine, IAA-phenylalanine, Pyridoxine, Riboflavine
متوسط	ABA, Adenine sulphate, L-ascorbic acid, L-asparagine, Kinetin, 2-iP, 2-iP riboside, Zeatin
عالي	Cystine, Benzyladenine riboside, Folic acid, Ca-pantothenate, L-glutamine,
عالى عند pH أعلى من ٥.٥	Thiamine, L-tryptophan, Urea
٤٠% (٢٠ دقيقة تعقيم)	IAA
٢٠% (٢٠ دقيقة تعقيم)	IBA
مواد مثبطة للنمو	Frctuse

مدة التعقيم طويلة حيث تنتج بعض المواد المثبطة للنمو عند تعقيم الجلوكوز مع الفوسفات والأحماض الأمينية. والجلوكوز الذى يضاف إلى بعض البيئات أو الناتج من تحلل السكر يمكن أن يتكسر بالحرارة فى وجود الفوسفات والوسط الحامضى وينتج عنه أنواع أخرى من السكريات. وقد وجدت بعض الاستجابات المختلفة فى زراعة الأنسجة عند مقارنة تعقيم السكر مع البيئة أو إضافته بعد تعقيمه بالترشيح. ويتضح من جدول رقم (٥-٥) أن بعض منظمات النمو تتكسر أثناء التعقيم. ويمكن من الناحية العملية فى الإكثار الدقيق إهمال التغير الحادث لمعظم الأوكسينات والسيتوكينينات أثناء التعقيم على الرغم من

ملاحظة تكسير جزء من IAA و IBA لكن يفضل تعقيم IAA و Kinetin و GA بالترشيح.

عزل وزراعة المُستأصَل النباتى

يتم عزل ونقل المُستأصَل النباتى إلى بيئة النمو بعد تعقيمه داخل كابينة الزراعة Laminar flow hood والتى يجب أن تعقم بالكحول قبل بدء العمل وتركها لمدة ١٥ دقيقة حتى نضمن أن الهواء الموجود فى حيز العمل قد تغير بهواء معقم. وإن كانت الكابينة مزودة بلمبات UV فينصح بتركها مضاءة لمدة نصف ساعة قبل العمل فى الكابينة لتعقيمها على ألا يستأنف العمل فى الكابينة إلا بعد حوالى نصف ساعة. وبعد معاملة النسيج بالمحلول المعقم وغسله عدة مرات بالماء المقطر المعقم داخل كابينة التعقيم يتم وضعه على سطح معقم كطبق بترى ويفضل وضع ورقة ترشيح معقمة ومبللة بالماء فى الطبق للمحافظة على رطوبة النسيج والشفرات المستعملة فى تقسيم المُستأصَل النباتى. وفى حالة الأنسجة الوعائية كالسوق يتم إزالة الجزء الطرفى الملامس لمحلول التعقيم والذى تغير لونه لأنها تموت غالباً، ثم يقطع المُستأصَل النباتى ويتم ذلك باستعمال آلة حادة مثل المشرط الجراحي أو أجهزة ثقب خاصة ذات أقطار مختلفة حسب الحاجة.

وكما سبق القول يجب توخى الدقة فى جعل الأجزاء المفصولة ذات أحجام متساوية بقدر الإمكان. وعند فصل القمم الميرستيمية يستعمل مجهر ذو قوة تكبير منخفضة للمساعدة فى عملية الفصل. وبعد ذلك ينقل الجزء المفصول إلى وعاء الزراعة وتختلف طريقة وضع الجزء المنزرع، فالبذور توضع على سطح البيئة لتوفير الأكسجين الضرورى للإنبات كذلك الأمر للقمم الميرستيمية. أما الأجزاء كبيرة الحجم مثل العُقل الساقية فيمكن وضعها أفقيا على سطح البيئة، أو غمس الجزء القاعدى منها فى البيئة. فى حين أن الأجزاء الرهيفة كأجزاء الأوراق يتم الضغط عليها برفق أثناء وضعها حتى يتم التلامس التام بينها وبين البيئة.

وتعتبر مهارة القائم بعملية صب البيئة فى أوانى الزراعة وإعداد ونقل الجزء المنزرع إلى المزرعة من العوامل الهامة جداً فى الحد من التلوث. فالفنى الماهر قد يستطيع إجراء هذه العملية بدون حدوث تلوث نهائى أو حدوثه بنسبة منخفضة. ومن الضرورى الأخذ فى الاعتبار بعض الاحتياطيات العامة للحد من التلوث ومنها:

- غسيل الأيدى بالماء والصابون جيداً قبل العمل ويمكن مسح الأيدى بالكحول مع ملاحظة أن الكحول يؤدى إلى جفاف الجلد.
- لبس قناع الوجه عند العمل.
- ملاحظة الجلوس أبعد ما يمكن عن كابينة التعقيم وعدم إدخال الرأس داخلها بأى حال من الأحوال.
- المحافظة بقدر الإمكان على الأيدى والساعدين غير ملامسين للكابينة.
- الاستدارة للخلف فى حالة العطس أو الكحة.
- يجب بقدر الإمكان حمل أوعية الزراعة فى وضع أفقى أثناء نقل الأجزاء المزروعة إليها لتقليل التلوث.
- عدم وضع المزيد من الأدوات الأخرى وأوانى الزراعة داخل الكابينة حتى لا تعوق حركة الهواء خاصة فى حالة الوحدات ذات الدفع الأفقى للهواء.
- توضع الأدوات بترتيب استعمالها حتى لا نضطر لتحريكها فوق بعضها البعض.
- عدم تمرير الأيدى أو أى أدوات فوق المزرعة إذا كانت الأوعية المحتوية عليها مفتوحة.
- الحرص الشديد بعدم ملامسة اليد لفوهة الوعاء أثناء نقل المزرعة من وعاء لآخر.

المشاكل الحشرية فى معمل زراعة الأنسجة

هناك أنواع مختلفة من مفصليات الأرجل مثل العناكب وبالتحديد التربس يمكن أن تلوث معمل زراعة الأنسجة حيث يمكنها حجمها الصغير من المرور إلى داخل الأوعية عبر الأغطية ومن ثم تتكاثر بسرعة كبيرة دون التنبه المبكر لوجودها، والذى يتضح بوجود التلوث على سطح البيئة. وكثيراً ما تتسرب هذه الحشرات إلى المعمل على ملابس العاملين به. ويشير West & Preece (2006) أن كائن واحد من تلك الكائنات يمكنه نظرياً أن يتكاثر فى معمل زراعة الأنسجة وينتج نسل يقدر بحوالى ٢٥.٠٠٠ فرد

خلال شهر وأكثر من خمسة مليون فرد خلال شهرين. ويعتبر النمل صغير الحجم المعروف بـ *Monomorium pharaonis* والمنتشر فى أغلب دول العالم أيضا من أكثر أنواع الحشرات المسببة لتلوث معامل مزارع الأنسجة. وبالرغم من أن الصراصير لا تدخل أوعية الزراعة إلا أن وجودها يعمل على إدخال ونشر ملوثات أخرى فى المعمل. وقد يكون من الصعب التخلص من النمل والصراصير فى بعض المعامل. ويمثل النمل والحشرات الأخرى مشكلة للمعامل طوال العام فى المناطق الحارة أما فى المناطق المعتدلة فإن المشكلة قد تنحصر فى فصل الصيف. ويعتبر ترك المزارع القديمة فى المعمل من العوامل المشجعة على وجود الحشرات حيث تعتبر النباتات والبيئة مصدر غذائى جيد لها.

وعلى العموم تعتبر الأكاروسات مصدر القلق الحقيقى فى معامل زراعة الأنسجة حيث يمكنها حجمها الصغير (طولها أقل من ١مم) من الانتقال من مكان لآخر بالغبار أو على الحشرات أو الحيوانات الأخرى والإنسان. ومن ثم يجب إتباع قواعد صارمة لمنع تسربها للمعمل. ويتضح وجود تلوث بالحشرات أو العناكب فى المزرعة بملاحظة التلوث الفطرى الحادث على سطح بيئة الزراعة حيث يأخذ شكل خطوط تمثل مكان سير الحشرات الموجودة بالمزرعة. ودورة حياة هذه الكائنات فى الظروف المعملية لزراعة الأنسجة قصيرة كما سبق الذكر لتوفر الرطوبة العالية فى الأوعية، وينتقل بيضها أو الطور غير الكامل لها عند نقل وتجديد المزرعة. ويجب أن يعقم كل المعمل بمجرد اكتشاف التلوث وتعقيم المزارع الملوثة قبل التخلص منها وكذلك المزارع التى لا تكون هناك حتمية للإبقاء عليها. أما تلك التى لا يتضح بها التلوث وتمثل أهمية بالغة للمعمل فيجب تعقيمها من الخارج بالكحول ثم يعاد غلقها بالأفلام البلاستيكية (البارفليم). وقد يضاف أحد المبيدات الحشرية مثل Acephate بتركيز ١٠-١٠٠ مليجرام/لتر من المستحضر التجارى المعروف باسم Orthene إلى بيئة النمو حيث يضاف إلى البيئة قبل التعقيم لأنه لا يتأثر بالتعقيم الحرارى (West & Preece, 2006). وكذلك استعمال أحد

المبيدات مثل Actellic فى دهان الجدران والأسقف. وقد استعمل أيضا مركب Fenbutan-oxid والموجود فى مستحضر تجارى يعرف بـ Vendex لدهان الأرفف كل ٦ أشهر للتغلب على وجود تلك الحشرات بالمعمل.

يعتبر التربس من الحشرات صغيرة الحجم والتى توجد غالباً فى منطقة القمة النامية للنبات حيث تتغذى على العصارة النباتية وتضع بيضها داخل أنسجة النبات تحت طبقة البشرة. وتسبب تلوث المزارع بعد تأسيسها حيث يفقس البيض المصاحب للنسيج المنزرع. ومن ثم يجب التأكيد من أخذ الأجزاء النباتية من نباتات غير مصابة بالحشرات. أما الحشرات كبيرة الحجم مثل النمل والصراصير فيمكن التحكم فى غزوها للمعمل بإحكام غلق الأبواب والشبابيك ووضع بعض المبيدات الخاصة حول الجدران الخارجية للمعمل.

مرحلة الأقلمة للظروف الطبيعية Acclimatization to natural environment

يعتبر نجاح عملية نقل النبيتات الناتجة تحت الظروف المعملية إلى الحقل والتى يطلق عليها الأقلمة acclimatization أو adaptation المقياس النهائى لنجاح البرنامج المستعمل لزراعة الأنسجة وقياس جدوى استعماله على النطاق التجارى. حيث تتعرض النباتات إلى صدمة مفاجئة تسبب موت الكثير منها. وتلعب درجات الحرارة، الرطوبة النسبية، شدة الإضاءة، تركيز ثانى أكسيد الكربون وسرعة حركة الهواء فى غرفة النمو وبالتالى تأثيرها على المناخ الدقيق دوراً كبيراً فى نجاح الأقلمة. ويرجع فناء عدد كبير من النبيتات عند نقلها إلى الظروف الطبيعية إلى الاختلاف الشديد بين النبيتات الناتجة من زراعة الأنسجة وتلك النامية فى الظروف العادية من حيث التركيب التشريحى والشكل الظاهرى وما يترتب على ذلك من خلل فى الوظائف المختلفة للأعضاء النباتية. فمن المعروف أن ظروف النمو فى مزارع الأنسجة تضمن أقل معدل إجهاد وأفضل ظروف لتكوين ونمو النباتات من حيث ارتفاع الرطوبة النسبية، مع توفير الكربوهيدرات فى

صورة جاهزة. كذلك تلعب منظمات النمو المضافة للبيئة دوراً فى التغييرات الظاهرية والوظيفية لهذه النبيتات (Wetzstein & Sommer, 1982). والتى قد تكون غير ذاتية التغذية تماماً heterotrophic أو على الأقل خليطه التغذية الضوئية photomexotrophic ويجب دفعها لتصبح ذاتية التغذية الضوئية photoautotrophic بتحوير وسط النمو. وهذا ما سيتم استعراضه فى الجزء التالى، وللمزيد من التفصيل حول هذا الموضوع يمكن الرجوع إلى المقالات المرجعية (Hazarika, 2003 & 2006) و (Pospíšilová *et al*., 1999 & 2007).

من الضرورى أن تحتوى البيئة على تركيز عالى من السكر والأملاح المعدنية لضمان التكشف والنمو. ومن الثابت الآن أن السكر المضاف للبيئة يؤثر على بعض عمليات الأيض الثانوية وبالتالى محتوى النباتات من المواد العضوية المختلفة. وقد يتبادر للذهن أن تلك الأوراق ربما تكون مكتنزة بالمواد الغذائية المختلفة التى امتصتها سابقاً من البيئة وبذلك تدعم النمو عند الأقلمة. وبالفعل كان معدل النجاح فى أقلمة نباتات *Potentilla fruticosa* و *Ficus lyrata* أعلى عند استعمال تركيز ٢-٤٪ من السكر وكذلك ارتفع الوزن الرطب والجاف للنباتات، وانخفض معدل نجاح الأقلمة ووزن النباتات عند استبعاد السكر من البيئة. وربما يكون للسكر أهمية فى زيادة النمو والتجذير أثناء الإكثار الدقيق فقد لاحظ Dang &Donnelly (1993) زيادة فى معدل تكوين الجذور وكثافة الشعيرات الجذرية لنباتات Rubus بخفض تركيز السكر وزيادة ثانى أكسيد الكربون، لكن قد تتباين هذه الاستجابة حتى بين أصناف النوع الواحد (Singh & Shyamal, 2001). وعموما يمكن القول أن خفض تركيز السكر يشجع من اعتماد النباتات على نفسها فى تخليق السكر وبعض منظمات النمو والفيتامينات الضرورية للنمو بعملية البناء الضوئى. وقد يلاحظ ارتباط موجب بين زيادة تركيز السكر والكتلة الحيوية ومعدل تكوين الكلوروفيل للعديد من النباتات المعملية خاصة عند زيادة شدة الإضاءة،

اشد حساسية للتثبيط الضوئى عند إضافة السكر للبيئة مما يشير إلى أن الارتباط بين إضافة السكر والتثبيط الضوئى يتوقف على التركيب الوراثى.

وهناك العديد من الأبحاث التى تؤكد زيادة معدل نمو النباتات الخضراء فى مزارع الأنسجة برفع تركيز ثانى أكسيد الكربون وشدة الإضاءة. وعموماً كان لنظرية التأثير الإيجابى للسكر على نجاح الأقلمة نصيب قليل من النجاح حيث يعتقد Hazarika (2003) أن الضرر الشديد الناتج عن فقد الماء من أنسجة الأوراق يفوق تأثيرها كمواد مخزنة فى الأوراق. لكن يصعب زيادة شدة الإضاءة الضرورية للبناء الضوئى لتماثل تلك فى البيوت المحمية نظراً لارتباط ذلك بحدوث التثبيط الضوئى لعملية البناء الضوئى. كذلك رفع درجة الحرارة يزيد التكاليف الخاصة بتبريد غرفة النمو. أضف إلى ذلك أن أغلب الأغطية المستعملة لا تسمح بتبادل الغازات بين غرفة النمو وجو المزرعة فينخفض تركيز ثانى أكسيد الكربون وبالتالى تنخفض كفاءة البناء الضوئى للنباتات بدرجة عالية فيلاحظ قصور فى تطور العضيات الخاصة بذلك على الرغم من أن الشكل الظاهرى للنباتات قد يبدو طبيعياً. وفقدت النباتات ثلاثية الكربون ذاتية التغذية الضوئية ما يقرب من ٥٠% من الكربون الذى تم تثبيته فى عمليات البناء الضوئى نظراً لعملية التنفس الضوئى تحت الظروف الطبيعية من تركيز الأكسجين (٢١%) وتركيز ٣٤٥ ميكرومول/مول من ثانى أكسيد الكربون، وبخفض تركيز الأكسجين إلى ١% توقفت عملية التنفس الضوئى (Hazarika, 2003).

وأشار Tichá *et al* (1998) إلى تباين محتوى أوراق النباتات المعملية من صبغات البناء الضوئى بالمقارنة مع النباتات فى البيت المحمى على أساس تركيز السكر وشدة الإضاءة فقد سجل Mohamed & Alsadon (2010b) انخفاض فى تركيز كلوروفيل أ و ب وكذلك الكلوروفيل الكلى لنباتات البطاطس النامية فى أوعية مغلقة وباستعمال بيئة تحتوى على ٣% سكر بالمقارنة من النباتات النامية فى أوعية تضمن

مما يعنى أن فرضية التأثير السلبى للسكر على تخليق الكلوروفيل ليست مطلقة (Koch, 1996).

لكن يحدث تثبيط لعملية البناء الضوئى عند زيادة شدة الإضاءة وتكون النباتات حساسة لهذه العملية تحت ظروف الإجهاد المختلفة ومنها نقص معدل عملية البناء الضوئى، كما يسبب انخفاض معدل ثانى أكسيد الكربون فى مزارع الأنسجة تثبيط ضوئى لعملية البناء الضوئى. وقد سجل (Serret *et al.*, 2000) ذلك فى مزارع *Gardenia jasminoides* باستعمال تركيز من السكر يتراوح بين ٠.٥ و ٣% وكثافة ضوئية ١٠٠-٣٠٠ مكرومول/م٢/ث وباستخدام أوعية تسمح بتبادل الغازات انخفض معدل التثبيط، لكن حدث التثبيط أيضاً لنباتات الدخان فى أوعية بدون أغطية عند ورفع شدة الإضاءة إلى ٧٠٠ مكرومول/م٢/ث (Semorádová *et al.*, 2002). وقد كان لزيادة ثانى أكسيد الكربون باستعمال أغطية تسمح بالتهوية دوراً فى التغلب على التثبيط الضوئى قبل وأثناء الأقلمة.

وربما يكون للسكر فائدة فى منع التثبيط الضوئى وإصلاح بعض العطب فى آلية هذه العملية، وبالتالى تزيد كفاءة البناء الضوئى بإضافة السكر بشرط كفاية محتوى الأوراق من صبغات البناء الضوئى. فقد وجد أن نباتات *G. jasminoides* التى نمت فى بيئة تحتوى على ٣% سكر وشدة إضاءة مرتفعة أقل تأثراً بالتثبيط الضوئى عند الأقلمة من تلك التى نمت فى وسط خالى من السكر وباستعمال شدة إضاءة منخفضة. وقد يرجع ذلك إلى تشجيع السكر للنمو الذى يعمل بدورة على تكوين خلايا جديدة لها قدرة أعلى على البناء الضوئى. ويوضح Ticha *et al.* (1998) أن نمو النباتات فى حالة photomixotrophic يزيد من معدل النمو وكفاءة البناء الضوئى مقارنة مع استعمال وسط خالى من السكر. وقد لعب إضافة تركيز منخفض من السكر دوراً فى الحد من التأثير المثبط للكثافة الضوئية على البناء الضوئى، لكن كانت نباتات *G. jasminoides*

عملية تبادل الغازات وخفض الرطوبة النسبية وباستعمال تركيز ٢% من السكر. وبزراعة نباتات *Phalaenopsis* فى بيئة تحتوى على ٣% سكر أو بدون السكر وتحت التركيز الطبيعى من ثانى أكسيد الكربون أو ١٠٠٠ ميكرومول/مول سجل Yoon *et al.* (2009) اختلافات فى معدل النمو. وقد زاد محتوى الأوراق من كلورفيل أ و ب وكذلك النسبة بينهما والنسبة بين الكلورفيل والكاروتينات بينما لم يتأثر محتوى الأوراق من الكاروتينات قبل الأقلمة أو بعدها عند إضافة السكر مع رفع تركيز ثانى أكسيد الكربون. وقد زاد معدل النتح فى أوعية الزراعة بزيادة تركيز ثانى أكسيد الكربون سواء بإضافة السكر أو بدون إضافة السكر للبيئة. كذلك زاد محتوى النباتات من السكر والنشا قبل الأقلمة وعقبها بزيادة تركيز ثانى أكسيد الكربون. ويشر ذلك إلى أن النباتات التى نمت فى المعمل تحت تركيز عالى من الغاز كانت ذات كفاءة عالية فى البناء الضوئى عند أقلمتها.

ولا يتوقف الأمر على صبغات البناء الضوئى إذ يلاحظ أيضاً نقص فى معدل إنزيمات البناء الضوئى مثل ribulose bisphosphate carboxylase (RubPcase). فعلى الرغم من نظام النقل الألكترونى الفعال فى النبتات المعملية فإن عملية البناء الضوئى لم تكن فعالة لنقص الكلوروفيل وإنزيم RubPcase ولم تنشط هذه العملية بالأوراق التى تطورت أثناء زراعة الأنسجة حتى بعد نقل النباتات للبيت المحمى. وقد ماتت تلك الأوراق عقب ذلك، لكن قد تمثل هذه الأوراق كما فى الفراولة مخزن يمد الأوراق الحديثة بالكربون والنشا (Grout, 1988). ويعتقد أنه فى بعض النباتات مثل Dieffenbachia قد يكون للأوراق التى تطورت فى المعمل القدرة على البناء الضوئى عند الأقلمة.

انخفض معدل صافى عملية البناء الضوئى للعديد من النباتات فى الأيام الأولى من أقلمة النباتات إلا أن هذا المعدل ارتفاع عقب ذلك وقد ارتبط ذلك بتكوين الأوراق

الحديثة فى البيت المحمى (Van Huylenbroeck *et al.*, 2000). وقد انخفض معدل البناء الضوئى خلال أربعة أسابيع من زراعة أشطاء Birch على الرغم من استعمال شدة إضاءة تتراوح بين ٢٠٠ و ١٢٠٠ ميكرومول/م٢/ثانية، لكن كان للنباتات فى البيت المحمى تحت نفس شدة الإضاءة القدرة على البناء الضوني (Smith *et al.*, 1986) لكن فى دراسة موسعة لعدة أنواع من نباتات الزينة سجل Kozai *et al.* (1987) انخفاض حاد فى تركيز ثانى أكسيد الكربون داخل أوعية الزراعة تراوح من ٣٠٠٠-٩٠٠٠ جزء فى المليون أثناء الظلام إلى أقل من ٩٠ جزء فى المليون أثناء فترة الإضاءة، مما يشير إلى قدرة النباتات على القيام بالبناء الضوئى. وقد يكون سبب بطء البناء الضوئى عقب ذلك نقص تركيز ثانى أكسيد الكربون. ومن ثم سجل صافى معدل عملية البناء الضوئى للعديد من النباتات المعملية مثل *Myrtus communis* زيادة برفع معدل تبادل الغازات فى الأوعية (Lucchesini *et al.*, 2001).

وباستعراض العديد من الدراسات حول صافى معدل عملية البناء الضوئى للنباتات المعملية يرى Pospíšilová *et al.* (2007) أن انخفاض معدل صافى عملية البناء الضوئى فى مزارع الإكثار الدقيق يرجع إلى نقص تركيز ثانى أكسيد الكربون فى الأوعية محكمة الغلق على الأقل فى النصف الأخير من فترة الإضاءة. وقد تأثر محتوى الأوعية من الغاز خلال اليوم الواحد على تركيز السكر بالبيئة. ويجب التأكيد على أن زيادة شدة الإضاءة دون رفع معدل ثانى أكسيد الكربون لا تزيد من كفاءة البناء الضوئى عند نقطة التعويض compensation point حيث تتساوى كمية غاز ثانى أكسيد الكربون الناتجة من التنفس مع التى تستهلك فى البناء الضوئى.

إنتاج نباتات ذاتية التغذية الضوئية Photoautotrophic

كما سبقت الإشارة قد تنمو النباتات فى مزارع الأنسجة بطريقة وسطية بين ذاتية التغذية الضوئية وغير ذاتية التغذية حيث تحصل على ثانى أكسيد الكربون من الوسط

الغازى والكربون العضوى المضاف فى صورة سكر من البيئة. وقد برزت أهمية تطوير تقنية الإكثار الدقيق لجعل النباتات ذاتية التغذية الضوئية بهدف تقليل تكاليف الإنتاج واستعمال الميكنة فى الإكثار الدقيق بواسطة Kozi & Iwanami (1998) حيث تمكن هذه التقنية من استعمال أوعية كبيرة الحجم مع خفض معدل التلوث. ويكون للأوراق التى تكونت فى المعمل القدرة على الحياة والقيام بالبناء الضوئى عند الأقلمة.

وتعد تكاليف الإكثار الدقيق من معوقات استخدامه على نطاق واسع خاصة فى الدول النامية، ويمثل السكر والآجار المستعمل لتصلب البيئة حوالى ٨٠% من تكاليف البيئة. وقد أشار Prakash *et al.* (2003) إلى أن تكاليف لتر واحد من بيئة MS المضاف إليها الآجار يصل إلى ٠.١٨ دولار أمريكى، وتنخفض القيمة إلى ٠.٠٨ فى حالة استبعاد الآجار. وإذا كانت المزرعة ذاتية التغذية ولا يتطلب الأمر إضافة السكر فإن التكاليف ستنخفض إلى ٠.١٣ و ٠.٠٣ دولار للبيئة الصلبة والسائلة على التوالى. ولاستعمال السكر فى البيئة مشكلة أخرى حيث يجعل البيئة وسط ملائم لنمو الكائنات الحية الدقيقة. لكن يتطلب الأمر تشجيع الأنسجة النامية المحتوية على الكلوروبلاست من القيام بعملية البناء الضوئى ظروف خاصة. وأضاف Kozai (1991) أن النباتات النامية تحت تلك الظروف تمتاز بمجموع جذرى قوى وقدرة أفضل على الاتزان المائى ومقاومة الفطريات أثناء الأقلمة (Jeong *et al.*, 1995).

فى نظام المزارع ذاتية التغذية الضوئية والتى يطلق عليها -PTCS "Photoautotrophic Tissue Culture System" يجب توفير تركيز عالى من ثانى أكسيد الكربون بمعدل ١٠٠٠-١٥٠٠ ميكرومول/مول من الغلاف الغازى للمزرعة مع شدة إضاءة لا تقل عن ١٥٠ ميكرومول/م٢/ث وبدون إضافة السكر أو استعماله بتركيز منخفض (Kozai *et al.*, 1997). ويمكن زيادة تركيز ثانى أكسيد الكربون فى الغلاف الغازى للمزرعة إما بدفع تيار منه إلى داخل أوعية الزراعة التى يفضل أن تكون كبيرة

الحجم أو برفع تركيزه فى حجرة الزراعة مع استعمال أغطية تسمح بالتبادل الغازى (Kozai &Iwanami, 1988) وقد أمكن الحصول على معدل نمو لنباتات القرنفل والأراولا والبرميولا تحت هذه الظروف يعادل النمو باستعمال السكر. وتبين النتائج الموضحة فى جدولى رقم (٥-٦) و (٥-٧) التأثير الإيجابى لزيادة تركيز غاز ثانى أكسيد الكربون على نمو النباتات، ويتضح أن زيادة الغاز قد تعوض نقص النمو النتائج عن عدم إضافة السكر.

جدول ٥-٦: نمو نبيتات *Chrysanthemum* بعد ٤ أسابيع من الزراعة فى بيئة شبه صلبة محتوية على السكر أو خالية منه تحت تركيز متباين من ثانى أكسيد الكربون (Kozai & Iwanami, 1988)

صفة النمو	٢% حجم/حجم CO_2		CO_2 الجوى	
	٢% سكر	٠% سكر	٢% سكر	٠% سكر
طول الأفرع (سم)	٣.٥	٢.٧	٢.٨	٢.٣
عدد الأوراق	١٨.٠	١٤.٠	١١.٠	٩.٠
طول الأوراق (سم)	٠.٩	٠.٩	٠.٩	٠.٨
عرض الأوراق(سم)	٠.٨	٠.٧	٠.٧	٠.٦
عدد الأشطاء	٦.٠	٤.٠	٤.٠	١.٠
عدد الجذور	-	٥.٠	-	-
طول الجذور(سم)	-	١.٨	-	-
الوزن الطازج (ملجم)	٢٩٢	٢٥٦	٢٦٠	١٦٧
الوزن الجاف (ملجم)	٦٢	٣١	٢٨	١٢

جدول ٥-٧: تأثير تركيز السكر و ثانى أكسيد الكربون (حجم/حجم) على نمو نباتات الاراولا بعد ٤ أسابيع من الزراعة فى بيئة سائلة Mitra *et al.* (1998).

صفة النمو	تركيز السكر					
	٠%		١%		٢%	
	تركيز CO_2					
	٢%	الجوى	٢%	الجوى	٢%	الجوى
طول الأفرع (سم)	٢.٥	٢.٣	١١.٥	٥.٢	١٢	٢.٨
عدد الأوراق	١٤	٩	١٢	٧	١٨	١٠
طول السلاميات(سم)	٠.٣	٠.٣	١.٤	.٠.٨	١.٠	٠.٣
عدد الأشطاء	٤	٢	١	١	٣	٢
عدد الجذور	٥	-	-	-	٥	-

وتعمل هذه الظروف على خفض الرطوبة النسبية فى جو المزرعة والتى تلعب دوراً فى ظاهرة التميز الزجاجى. وقد أمكن باستخدام هذه الأنواع من الأغطية وبدون زيادة فى تركيز ثانى أكسيد الكربون زيادة معدل نمو ومحتوى الكلوروفيل لنباتات البطاطس (Mohamed & Alsadon, 2010b). وفى نباتات الدخان زاد محتوى أوراق النباتات ذاتية التغذية الضوئية من صبغات البناء الضوئى عند أقلمتها لكن حدث انخفاض فجائى فى هذه الصبغات للنباتات خليطة التغذية الضوئية فى الأسبوع الأول من الأقلمة أعقبه زيادة فى الأسبوع التالى (Kadlecek *et al.*, 1998). زرع Mitra *et al.* (1998) عقد ساقية بطول ١سم من نباتات *Chrysanthemum* فى بيئة MS سائلة أو شبه صلبة مضاف إليها ٠.١ ملجم/لتر IAA و ٠.٢ ملجم/لتر والسكر بتركيز صفر أو ٢٠ جم/لتر. وتم تدعيم النمو فى البيئة السائلة باستعمال ورق الترشيح أو القطن. وتم رفع تركيز غاز

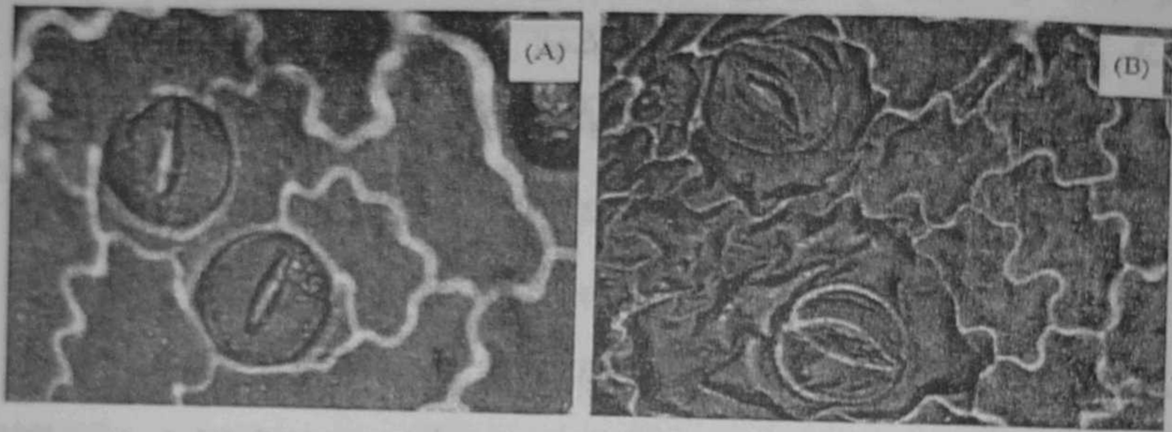
ثانى أكسيد الكربون ورطوبة نسبية ٦٢% وشدة إضاءة ٧٤ مليمول/م٢/ثانية لمدة ١٦ ساعة يومياً لمدة ٣٠ يوم لرفع كفاءة الأقلمة. ويتضح التأثير الجوهرى فى ظروف النمو المشجعة لإنتاج نباتات خليطة التغذية الضوئية فى:

١. تركيب الثغور

يعتبر الفقد السريع للماء من الثغور والأسطح الخارجية للنبات من أهم مشكلات الأقلمة حتى لو كان الجهد المائى لمحلول التربة المستعملة فى الأقلمة أعلى من الجهد المائى للبيئة. ففى العديد من النباتات فقدت الثغور الاستجابة للعوامل البيئية التى من شأنها غلق الثغور، ولعل الخلل الذى يصيب تركيب الثغور من حيث حجم الخلايا الحارسة وطول وقطر فتحة الثغر هو السبب وراء ذلك.

لكن يلعب الطرز الوراثى دوراً هاماً فى كثافة الثغور وتركيبها التشريحى فى النباتات المعملية فعلى سبيل المثال لم يكن هناك اختلاف فى تركيب الثغر وآلية عمله للعديد من الأنواع النباتية منها الطماطم والبطاطس وغيرها، ومن ثم نجد أن معدل أقلمة تلك النباتات قد يصل إلى ١٠٠% حتى بدون التدقيق فى علمية الأقلمة (Mohamed *et al.* 1999) باستخدام نباتات *Tagetes minuta*. وبالفحص المجهرى يتضح الفرق بين تركيب ثغور النباتات المعملية وتلك النامية فى البيوت المحمية أو الحقل. وتأخذ الثغور الشكل الدائرى أو الهلالى وليس البيضاوى أو الكلوى كما فى النباتات فى البيوت المحمية (شكل رقم ٥-٣). وبالنظر إلى معامل عدد الثغور وهو عبارة عن عدد الثغور منسوباً لعدد خلايا البشرة فقد يسجل ارتفاعاً فى بعض الأنواع أو انخفاضاً فى الأخرى بالمقارنة مع النباتات النامية فى البيت المحمى، فقد انخفضت هذه النسبة فى أوراق نخيل البلح المعملية بالمقارنة مع النباتات فى البيوت المحمية، ولم ترتفع حتى بعد المعاملة بمركب PEG. وقد انخفضت كثافة الثغور عقب نقل النباتات للبيت المحمى. لكن لاحظ (Pospisilova *et al.*, 1999) عدم تغيير عدد الثغور بالسطح العلوى والسفلى لأوراق

الدخان، لكن نظراً لسرعة نمو الأوراق عقب الأقلمة فقد زاد عدد الثغور للضعف. وتساعد خفض الرطوبة وتركيز السكر فى بيئة الزراعة على خفض عدد الثغور والتى أخذت شكلاً بيضاوياً كتلك المميزة للنباتات فى البيت المحمى على العكس من النباتات التى نمت فى أوعية زراعة عادية مع رفع نسبة السكر فى البيئة (Mohamed &Alsadon, 2010b) وتشير هذه الدراسة وغيرها إلى انخفاض عدد الثغور للنباتات خليطة التغذية الضوئية أو ذاتية التغذية الضوئية عقب النمو فى البيت المحمى.



شكل ٥- ٣: شكل الثغور فى أوراق نباتات البطاطس(A) خليطة التغذية الضوئية (B) وغير ذاتية التغذية (Mohamed & Alsadon, 2010b).

٢. التركيب التشريحى للأوراق

تكونت طبقة الميزوفيل فى أوراق الدخان المعملية من طبقة واحدة مفككة من الخلايا العمادية غير تامة التطور وثلاث طبقات أو طبقتين من الخلايا البرانشيمية الأسفنجية. وفى بعض النباتات مثل *Vaccinium corymbosum* كانت طبقة الميزوفيل مكونة من طبقة أو طبقتين من الخلايا الأسفنجية ذات الفجوات العصارية الكبيرة ومحتوى منخفض من السيتوبلازم مع خلل فى تكوين أغشية الكلوروبلاست، وربما زادت المسافات البينية بين تلك الخلايا وهذا الاختلاف يسبب إعاقة فى عملية التبادل الغازى (Pospíšilová *et al.*, 1999). وقد أشار أيضاً إلى تطور طبقة من الخلايا العمادية فى أوراق *Brassica oleracea* بعد ثلاثة أسابيع من الأقلمة، وبالتالى زاد سمك

الورقة عقب الأقلمة مع انخفاض المسافات البينية. وتوضح النتائج التى تحصل عليها Serret & Trilla (2000) من الدراسة المورفولوجية والتشريحية لأوراق نبيتات *Gardenia jasminoides* الناتجة من زراعة الأنسجة أن هذه الاختلافات تتأثر بتركيز السكر فى البيئة بالإضافة إلى شدة الإضاءة المستعملة كما هو مبين فى جدول رقم (٤-٣).وقد أوضحت النتائج أن الخلايا الحارسة كان بها عدد أقل من الريبوسومات والميتاكوندريا والبلاستيدات الغنية بالنشا وعدد من الفجوات العصارية كما أوضحها Serret & Trillas (2000) فى الجدولين رقم (٥-٨) و (٥-٩). ويبين (Mohamed & Alsadon, 2010b) أن خفض تركيز السكر إلى ٢% مع استخدام أوعية تسمح بالتهوية يشجع الحصول على تركيب تشريحى لأوراق البطاطس يشابه تلك النامية فى البيت المحمى، مما يحسن من الأقلمة.

٣. طبقة الكيوتيكل

وهو عبارة عن الطبقة السطحية اللاخلوية لأنسجة النبات ويتم إفرازها بواسطة خلايا البشرة وتتركب من حشوه من الكيوتين منغمس بها الشمع لتغطى سطح النبات. والدور الأساسى لهذه الطبقة هو الحد من فقد الماء بالنتح من أسطح النبات والذى يتأثر معدله بسمك وتركيب هذه الطبقة. ويعتبر التركيب الفقير لهذه الطبقة وعدم اتصالها على سطح الأنسجة من أهم العوامل التى تسبب سرعة فقد الماء أثناء الأقلمة Hazarika *et al.* (2002). وقد وجد انخفاض كبير فى التركيب البلورى لطبقة الكيوتيكل للنباتات المعملية بالمقارنة مع تلك فى البيت المحمى.

لكن هناك بعض الإستثناءات التى لم يلاحظ فيها فرق فى تكوين الكيوتيكل بين النباتات المعملية وتلك فى البيوت المحمية (Pospíšilová *et al.*, 2007). وبخفض الرطوبة النسبية فى أوعية الزراعة والتى تصل فى الحالات العادية إلى ٩٨-١٠٠% حيث تلاحظ قطرات الماء على الأسطح الداخلية يزيد معدل تكوين الكيوتيكل وبالتالى الأقلمة. وهناك العديد من المعاملات التى تتبع للحد من ارتفاع الرطوبة داخل القوارير

وللحد من فقد الماء بالنتح عند الأقلمة ومن هذه المعاملات التى أوردها Hazarika (2003) فيما يلى:

جدول ٥-٨: تأثير تركيز السكر وشدة الإضاءة على بعض الصفات التشريحية لأوراق نبيتات *Gardenia jasminoides* الناتجة من زراعة الأنسجة Serret & Trilla (2000).

الصفات		شدة الإضاءة (mmol m^2s^2 PPFD) ١٠٠ تركيز السكر جم/لتر ٣٠	١٠٠ تركيز السكر جم/لتر ٥٠	٥٠ تركيز السكر جم/لتر ٣٠	٥٠ تركيز السكر جم/لتر ٥٠
Thickness (mm)	Epidermis	٢٣.٦٨	٢٤.١٥	٢٤.٠٩	٢٤.٧٩
	Mesophyll	٤٠.٣٤	٥١.٢٦	٤٩.٦٠	٨٤.٠١
	Total leaflet	٦٤.٠٣	٧٥.٤٠	٧٤.٦٠	٧٢.٨٠
Relative volume	Palisade parenchyma (P)	٢٦.٣٨	٢٥.٨٣	٢٢.٤٣	٢٠.٥٣
	Spongy parenchyma	٦٣.٢٥	٥٦.٤٠	٦١.٨٩	٦٣.٠٦
	Air space	١٠.٣٦	١٧.٦٩	١٥.٦٧	١٦.٤٠
	P/S	٠.٤٢	٠.٤٨	٠.٣٦	٠.٣٣
Relative volume (%	Epidermis	٣٧.١٧	٣٢.١٦	٣٣.٥٧	٣٤.٠٧
	Palisade parenchyma	١٦.٦٠	١٧.٤٧	١٤.٨٨	١٣.٥٧
	Spongy	٦٩.٦٩	٣٨.٣٤	٤١.١٥	٤١.٦٣
	Air spaces	٦.٥٥	١١.٩٢	١٠.٤٠	١٠.٧٨
Cross-sectional area (mm^2):	Palisade cell	٥٦.٩٤	٨٤.٦٣	٧٤.٤٠	١٠٨.٨٧
	Spongy cell	٨٤.١٥	٨٤.٨٥	٩٠.٧١	١٦٠.٨٧

جدول ٥-٩: تأثير تركيز السكر وشدة الإضاءة على بعض الصفات التشريحية لأوراق نبيتات *Gardenia jasminoides* الناتجة من زراعة الأنسجة Serret & Trilla (2000).

الصفة	شدة الإضاءة (mmol m^2s^2 PPFD)							
	١٠٠		٥٠		١٠٠		٥٠	
	تركيز السكر جم/لتر							
	٥	١٠	٥	١٠	٥	١٠	٥	١٠
	الخلايا البرانشيمية				الخلايا الإسفنجية			
Chloroplasts	٢.٥	٣.٧	٥.٣	٣.٦	٢.٧	٤.٣	٥.١	٣.٢
Chloroplasts/ mm^2 cell ($x10^2$)	٤.٧	٤.٧	٧.٣	٣.٦	٣.٥	٥.٥	٥.٧	٢.٤
Starch grains/ chloroplast	١.٠	١.٦	١.٦	٠.٩	٥.٠	١.٤	٧.٠	٠.٧
Plastoglobules/ chloroplast	١٠.٢	٨.٨	٧.٩	٦.١	٦.٤	٥.١	٥.٧	٩.٦
Mitochondria/ cell	٣.٥	٢.٢	٣.٨	٦.٧	٢.٩	٣.١	٤.٢	٤.٤

أ. استخدام معوقات النمو: استخدمت معوقات النمو بنجاح فى بعض الدراسات لزيادة معدل الأقلمة وذلك لتأثيرها على معدل فقد الماء من البادرات. وتعمل معوقات النمو غالباً على تقصير طول السلاميات وصغر حجم الأوراق وزيادة معدل اللون الأخضر فى الأوراق، كذلك يزيد سمك الجذور عقب المعاملة بمعوقات النمو. وباستعراض العديد من الدراسات حول استخدام معوقات النمو فى أقلمة النباتات يرى Hazarika (2003) أن تلك المركبات يمكنها أن تقلل الضرر الراجع للذبول أثناء الأقلمة، وبدون تأثير سلبى على النمو. فمعاملة نباتات *Malus domestica* بمركب Paclobutrazol وهو من معوقات النمو التى تستخدم بنجاح

مع العديد من النباتات ثبطت إنزيم kaurene oxidase وبالتالى منعت أكسدة ent-kaurene إلى حامض ent-kaurenoic ومن ثم وقف تخليق حامض الجبريلك. وقد أدت إضافة paclobutrazol بتركيز ٠.٥-٤ ملجم/لتر إلى بيئة تجذير Chrysanthemum إلى خفض فى فتحات الثغور، وزيادة الطبقة الشمعية على الأوراق مع زيادة تركيز الكلورفيل بها، وتقصير الساق، وزيادة سمك الجذور وكان من شأن ذلك خفض معدل الذبول عند الأقلمة. وأمكن الحصول على نتائج مشابهه فى العديد من النباتات منها عدة أنواع من الحمضيات و الورد. وبمعاملة شتلات التفاح بمركب paclobutrazol زاد تركيز الكربوهيدرات والكلورفيل والبروتينات الذائبة والعديد من العناصر المعدنية فى أنسجة الأوراق وقل تركيز السكريات العديدة فى الجدر الخلوية وفقد الماء. وصاحب ذلك زيادة فى معدل تنفس الجذور وتراكم حامض الأبسيسك (Steffens *et al.*, 1985 & Wang *et al.*, 1987). لكن استجابة الشتلات العادية لمعوقات النمو أعلى من النباتات الناتجة من الإكثار الدقيق وذلك لقلة عدد الجذور والشعيرات الجذرية مما يقلل من معدل امتصاص تلك المركبات من وسط النمو.

ب. **استخدام مضادات النتح:** يشير Hazarika (2003) إلى دور بعض مضادات النتح فى أقلمة النباتات لكن كانت نتائج استعمالها متعارضة بين التأثير الإيجابى والسلبى الراجع إلى تأثيرها على عملية البناء الضوئى والسمية الضوئية. بينما كان لتغطية أوراق العديد من العشبيات ببعض المواد كالجلسرول وشمع البارافين والزيوت تأثير فى خفض معدل النتح عند الأقلمة، لكن لم تجرب على مستوى النباتات الخشبية. وأمكن خفض معدل نتح أوراق cauliflower عند رشها بتركيز ١٠ مكرومول من حامض الأبسيسك، لكن لم يلاحظ فرق كبير فى معدل النتح للأوراق التى تكونت عقب الأقلمة وربما يتأثر فعل هذا الحامض بدرجات الحرارة. قفلت ٥٦% من ثغور بادرات التفاح فى مزارع الأنسجة بعد ٤ ساعات

من المعاملة بالمانيتول. وبعد ساعة واحدة من المعاملة بمركب folicote ومن ثم زاد معدل الأقلمة مقارنة مع الأقلمة تحت رزاز من الماء.

ج. **خفض الرطوبة النسبية :** من الثابت تعرض النباتات التى تتطور فى قوارير ذات رطوبة نسبية منخفضة لمشاكل أقل عند أقلمتها حيث يكون التركيب التشريحى والوظيفى أقرب للحالة الطبيعية. ومن العوامل الفعالة فى تحسين التركيب التشريحى للأوراق هو خفض الرطوبة النسبية فى القوارير لتماثل تلك فى غرفة النمو. وهناك العديد من المعاملات لتحقيق ذلك منها استعمال بعض المواد ذات الميل العالى لامتصاص الرطوبة وتغطية سطح البيئة بمواد زيتية لوقف البخر منها. لكن لاحظ Wardle *et al.*, (1983) موت الكثير من النباتات chrysanthemum وانخفاض معدل تكوين الجذور عند تغطية سطح البيئة بزيت lanolin أو استعمال السليكا جيل لخفض الرطوبة فى القوارير. وينصح البعض بفتح الأوعية تحت ظروف التعقيم لبعض الوقت الذى يزداد تدريجياً لعدة أيام قبيل الأقلمة. كما أن لتبريد قاعدة القوارير تأثير إيجابى فى خفض درجة حرارة البيئة وبالتالى الحد من تبخر الماء منها. وكما سبقت الإشارة فإن كثير من الدراسات تشير إلى الدور الفعال للأغطية التى تسمح بالتبادل الغازى وخروج الرطوبة فى نجاح الأقلمة. كما تشير إلى إمكانية خفض الرطوبة فى قوارير زراعة القرنفل والتى قدرها بـ ٨٥% بزيادة تركيز السكر أو الآجار وكذلك باستعمال بعض المركبات المؤثرة فى الضغط الأسموزى مثل البولى إثيلين جليكول. وقد زاد معدل تكوين الأشطاء بإضافة تلك المواد (Leshem, 1983).

يتضح مما سبق ضرورة الاهتمام بعملية أقلمة النبيتات عند نقلها خارج المعمل حتى يمكنها التأقلم مع التغيرات البيئة الجديدة. وبالرغم من اختلاف عملية الأقلمة بين

النباتات المختلفة فهناك بعض الاحتياطات العامة لرفع نسبة نجاح الأقلمة والتى يمكن حصرها فيما يلى:

١. تكوين على الأقل مبادئ الجذور فى بيئة سائلة قبل النقل مباشرة.

٢. خفض الرطوبة فى الأوعية المحتوية على النبيتات باستخدام أغطية منفذه للبخار أو تبريد القاعدة. وقد تترك الأغطية مفتوحة جزئيا فى جو معقم وليكن كابينة الزراعة لخفض الرطوبة النسبية. لكن يعاب على كل هذه المعاملات جفاف البيئة مما يعيق سحب الجذور منها دون حدوث ضرر.

٣. يمكن الإقلال من معدل فقد الماء من النبيتات بمعاملتها ببعض المواد مثل Paclobutrazol, ABA, IPA أو BAP. أو ترش ببعض المواد المقللة للنتح مثل Clear spray, DC200, Exhalt 4-10, Folicote, protec Aquawittess

٤. إزالة البيئة العالقة حول الجذور لأنها وسط ملائم لنمو الكائنات الدقيقة. مع ملاحظة عدم إحداث ضرر بالجذور المتكونة بقدر الإمكان ويمكن إجراء ذلك تحت تيار بطئ من الماء.

٥. إزالة بعض الأوراق المتكونة للحد من فقد الماء ودفع النباتات لتكوين أوراق جديدة للقيام بالبناء الضوئى.

٦. معاملة الأفرع ببعض الأوكسينات لتشجيع تكوين الجذور عقب النقل.

٧. تزرع النبيتات فى تربة جيدة يتم نخلها حتى نضمن نعومتها أو تستعمل تربة صناعية مثل الفيرموكيوليت أو البيتموس ويفضل تعقيم التربة بالبخار أو أشعة جاما قبل النقل على أن توضع هذه التربة فى أصص مثقبة من أسفل.

٨. تعامل النباتات بالمبيدات الفطرية لمقاومة فطريات الذبول.

٩. تحتاج بعض النباتات خاصة الأبصال وبعض الأشجار والشجيرات إلى معاملة بالبرودة على درجة ٥ °م لمدة ٤-٨ أسابيع لكسر طور السكون.

١٠. النباتات التى تكون أجزاء أرضية تستعمل للتكاثر مثل البطاطس والداليا يفضل نقلها على هذه الصورة لتحسين نسبة نجاح الأقلمة.

١١. يفضل رفع نسبة ثانى أكسيد الكربون لو أمكن حيث يسرع ذلك من دفع النباتات للقيام بالبناء الضوئى وتحولها من نباتات غير ذاتية التغذية إلى ذاتية التغذية.

١٢. توضع الأصص فى وعاء أكبر مملوء بالماء وتغطى النباتات والوعاء المحتوى على الماء بغطاء بلاستيك ليضمن مستوى عالى من الرطوبة النسبية.

١٣. تقلل الكثافة الضوئية باستعمال قماش على الأقل فى الأيام الأولى من الأقلمة على أن ترفع الكثافة الضوئية تدريجياً. حيث تسبب الزيادة المفاجئة فى شدة الإضاءة تثبيط ضوئى وربما يحدث تكسير للكلوروفيل (Van Huylenbroeck *et al.*, 1995 & 2000)

١٤. رفع الغطاء البلاستيكى تدريجيا بعد عدة أيام وقد يتم ذلك بإحداث ثقوب يزاد عددها تدريجيا إلى أن يزال الغطاء كلياً.

١٥. بعد ذلك يتم نقل النباتات من الوعاء المحتوى على الماء وتزرع فى بيتموس أو تربة عادية.

يتضح مما سبق أن جل المحاولات لرفع معدل أقلمة النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة كان فى تحوير الظروف البيئية فى القوارير وكذلك فى البيت المحمى. لكن فى السنوات الأخيرة أشارت الكثير من الدراسات إلى دور الفطريات التكافلية المعروفة بـ arbuscular mycorrhizal (AMF) فى زيادة معدل الأقلمة وتحسين نمو وتطور العديد من النباتات عقب الأقلمة التى تمت فى فترة أقل. وقد ذكر Kapoor *et al.* (2008) العشرات من النباتات ما بين أشجار وحوليات التى تم تلقيحها بـ AMF عند الأقلمة. وتضم AFM العديد من أنواع الفطريات Glomeromycota phylum التى توجد فى التربة وتكون علاقة تكافلية مع جذور ما يقرب من ٨٠% من النباتات أغلبها من مغطيات البذور. ويقوم الفطر بإرسال الهيفات إلى داخل الخلايا النباتية للحصول على الكربون بينما ينتشر باقى الفطر خارج النبات فى التربة لامتصاص الماء والعناصر المعدنية منها وتهدف هذه العلاقة إلى حصول الفطر على الكربون من النبات بينما يقوم

الفطر بمد النبات بالفسفور وبعض العناصر الأخرى كما أنها تزيد مع تحمل النبات لبعض عوامل الإجهاد الحيوى والبيئى وبذلك تحقق العديد من الفوائد سواء للنبات أو للبيئة. ونظرا للفروق الجوهرية بين الظروف البيئة فى القوارير والبيت المحمى وكذلك للتباين بين مواصفات النباتات الناتجة فى القوارير وتلك النامية فى البيت المحمى فإن تلقيح النباتات بهذه الفطريات عند بدء الأقلمة أو قبل نقلها من القوارير يرفع معدل الأقلمة (Puthur *et al.* (1998 و (Yano-Melo *e t al.* (1999 ويزيد من قوة النمو بتنشيط نمو المجموع الجذرى وزيادة كفاءة البناء الضوئى وخفض معدل النتح وامتصاص الماء والعناصر من التربة (Azcon-Aguilar *et al.*, 1996) و (Jaizme-Vega *et al.*, 2003). وقد سجل (Estrada-Luna *et al.* (2000 زيادة فى معدلات النمو وكفاءة عمل الثغور ومحتوى نبات *Psidium guajava* من الفوسفور والماغنسيوم والنحاس عند نجاح تلقيحها بفطريات AMF عند أقلمتها.

ويفضل التلقيح باستعمال هيفات الفطر وليس الجراثيم حيث يلاحظ اختراقها للجذور خلال فترة قصيرة قد تكون ساعات على العكس من الجراثيم التى قد تستغرق أسابيع لإحداث العلاقة. لكن هناك العديد من المشكلات التى تعيق عملية تلقيح النباتات أثناء نموها فى القوارير بهذه الفطريات ومنها التلوث عند إضافة اللقاح وطبيعة نمو العلاقة الإجبارية التطفل للفطر وكذلك لبعض الاختلافات الفسيولوجية أثناء نمو النبات فى القوارير (Rai, 2001) . ومن ثم فإن أغلب الدراسات تعتمد على التلقيح بجراثيم الفطر عند نقل النباتات إلى البيت المحمى. وعلى الرغم من اعتبار العلاقة بين النبات و AMF غير متخصصة فإنها تتوقف على بعض العوامل الفسيولوجية والتركيبية للنبات والفطر التى تتباين بشدة مما يسبب عدم تكوين العلاقة بين الفطر والنبات. لكن يعيق التطبيق الواسع للتلقيح بهذه الفطريات صعوبة الإنتاج الكمى للقاح.

وفى النهاية لا بد من توضيح أن نقل وتسويق النباتات الناتجة من مزارع الأنسجة إلى مكان الزراعة المستديم أو إلى المستهلك يتطلب عناية خاصة، وقد يفقد الكثير من النباتات أثناء عملية التسويق خاصاً إذا لم يتم أقلمة النباتات لوقت كافى فى البيت المحمى بعد نقلها من المعمل تحت دافع تقليل التكاليف. ولذا ينصح فى الشركات التجارية تخصيص مكان مستقل لإجراء عملية التغليف والتسويق. وغالباً يتم أقلمة نباتات الموز الناتجة من مزارع الأنسجة فى أكياس بلاستيكية سوداء اللون ويساعد ذلك على نقلها للتربة بنجاح فى المكان المستديم. ويجب اختيار مواد تغليف تتناسب مع درجات الحرارة والرطوبة التى ستتعرض لها النباتات أثناء عملية النقل. ولا شك أن ذلك يرتبط بنوعية النباتات فعلى سبيل المثال يمكن تغليف ٤٠٠٠٠ نبات lily فى طرد يزن ٢٢ كجم بينما لا يمكن تغليف سوى نصف هذا العدد من نباتات *Spathiphyllum* أو ١٠٠٠٠ فقط من نباتات *Syngonium* بينما ينخفض هذا العدد إلى ٧٠٠٠ نبات *Cordyline* ويرجع ذلك إلى اختلاف معدل التنفس فى تلك النباتات وبالتالى كمية الحرارة الناتجة منه (Ahloowalia &Prakash, 2004). إذا كانت النباتات ستنقل فى المناطق الحارة فيفضل استعمال مواد خافضة للحرارة مثل الثلج والثلج الجاف.

الفصل السادس

الإكثار الدقيق وزراعة الأعضاء والأنسجة النباتية

تتكاثر النباتات جنسياً أى باستخدام الجنين الجنسى الناتج من عملية التلقيح والإخصاب، أو باستخدام أى جزء من النمو الخضرى من النبات فيما يعرف بالتكاثر الخضرى أو اللاجنسى. والنباتات الناتجة بالتكاثر الجنسى فى النباتات خلطيه التلقيح تكون غالباً متباينة فى تركيبها الوراثى وغير مشابهة للنبات الأم حيث أنها تجمع صفاتها الوراثية من الأبوين. لكن يمكن إنتاج نباتات متشابهة وراثياً عن طريق التربية الداخلية لهذه المجموعة كما أن أفراد الجيل الأول الناتجة من تهجين أبوين homozygous تكون متشابهه فيما بينها. أما النباتات الناتجة من التكاثر الخضرى التقليدى فتكون فى معظم الأحيان متشابهة فى صفاتها ومشابهه للنبات الأم لأنها ناتجة بالانقسام الميتوزى للخلايا أى بدون إنعزالات أو توافيق وراثية جديدة. ويطلق على مجموعة النباتات الناتجة بالإكثار الخضرى لنبات واحد السلالة الخضرية vegetative clone. وبالطبع من المفضل من الناحية الزراعية لاعتبارات عديدة أن تكون جميع النباتات فى الحقل متشابهة فى صفات نموها، وهذه الميزة لا تتوفر فى حالة الإكثار الجنسى للنباتات خلطية التلقيح. وعلى الرغم من ذلك فالتكاثر الجنسى له عدة مميزات كوسيلة للتكاثر منها:

١. ينتج عنه عدد كبير من النباتات وبالتالى انخفاض تكاليف الإنتاج.
٢. إمكانية حفظ البذور لمدة طويلة دون فقد لحيويتها.
٣. سهوله نقل وتوزيع البذور.
٤. أغلب الأمراض لا تنتقل عن طريق البذور.
٥. استخدامه فى التحسين الوراثى المستمر وإنتاج أصناف جديدة من النباتات بطرق التربية المختلفة لتحقيق رغبات المنتجين والمستهلكين.

لكن الكثير من النباتات الزهرية كأغلب المحاصيل البستانية وبعض المحاصيل الحقلية لا تعطى بذوراً على الإطلاق، أو تعطى كمية قليلة من البذور بعد فترة من النمو

قد تكون طويلة جداً. وربما تكون حيوية البذور منخفضة حتى بمجرد تكوينها أو تفقد هذه الحيوية بعد فترة وجيزة. وفى بعض الأحيان تكون البذور الحقيقية وسيلة غير مناسبة للإنتاج التجارى كما فى البطاطس والفراولة. لذلك هناك ضرورة للإكثار الخضرى للكثير من الحاصلات الزراعية. وتتعدد صور الإكثار الخضرى التقليدى لكن تعتمد كلها على استخدام جزء كبير نسبياً من النبات الأم لتكوين نبات جديد. ويتوقف مدى الاعتماد على طريقة ما من طرق التكاثر الخضرى لإكثار نوع معين من النباتات على إمكانية إكثاره بهذه الطريقة وتكاليف الإكثار وتحقيق الغرض من ذلك. فالبطاطس مثلا يمكن إكثارها بطرق التكاثر الخضرى التقليدية لكن لإنتاج نباتات خالية من الفيروس لابد من استخدام مزارع الأنسجة. ولقد لعبت طرق الإكثار الخضرى باستخدام الدرنات، والكورمات، والأبصال، والعقل، والترقيد، والتقسيم، والتطعيم دوراً كبيراً فى إكثار العديد من المحاصيل الهامة مثل التفاح، والموز، وقصب السكر، والبطاطس، والفراولة ومعظم نباتات الزينة. كذلك يعتبر الإكثار الخضرى من الأهمية بمكان فى مجال تربية النبات فحفظ الأصول الوراثية لبعض الآباء لا يتم إلا بالإكثار الخضرى. والتكاثر الخضرى مهم أيضا للحصول على كمية كافية من البذور من بعض التراكيب الوراثية المرغوبة لتكوين سلالة Clone لحفظها فى بنك الجينات.

بالإضافة إلى ذلك فإن إكثار بعض الطفرات النافعة التى لا تكون بذوراً كالبرتقال والجوافة عديما البذور، يتم بطريقة الإكثار الخضرى. وتعتبر الطرق التقليدية للإكثار الخضرى غير وافية لحاجة الإنتاج الزراعى من حيث البطء، والصعوبة، وارتفاع التكاليف ومن ثم كانت هناك حاجة ملحة لدراسة إمكانية إكثار النباتات معملياً للتغلب على العقبات المشار إليها. لكن تظل طرق التكاثر الخضرى التقليدية الأساس الذى تمخض عنه الإكثار الدقيق. كما تعتبر زراعة الأنسجة مرحلة أساسية من مراحل استخدام التكنولوجيا الحيوية للتحسين الوراثى. لكن تتوقف إمكانية إكثار نبات ما فى القوارير على التركيب الوراثى والعوامل البيئية التى ينمو فيها النبات بالإضافة إلى

العوامل البينية أثناء إكثار النبات كما سبق توضيحه. وتتوقف الطريقة المستخدمة فى إكثار نبات ما باستخدام زراعة الأنسجة على قدرته الوراثية على التكاثر بهذه الطريقة فبعض النباتات يمكنها تكوين براعم عرضية على جذورها وبالتالى يمكن إكثارها فى مزارع الأنسجة باستخدام الجذور على العكس من النباتات التى لا تمتلك هذه الخاصية. ويجب الإشارة إلى أنه بالرغم من أن زراعة الأنسجة تستخدم للتغلب على بعض مشاكل التكاثر الخضرى إلا أن طبيعة التركيب الوراثى للنوع لها تأثير واضح فلا يمكن مثلا أن ندفع أشجار التفاح لتكون درنات. وبصورة عامة يمكن القول أن البرنامج الناجح فى الإكثار المعملى لا بد أن يفى بالأغراض التالية:

١. الثبات الوراثى للنباتات الناتجة أى عدم حدوث طفرات.
٢. خلو النباتات الناتجة من الأمراض ويعتمد ذلك على استخدام مصادر خالية من الإصابة.
٣. أن تكون عملية نقل النباتات للحقل سهلة ونسبة نجاحها عالية.
٤. احتفاظ النباتات بقدرتها على التضاعف باستمرار إكثارها معمليا.
٥. سهوله البرنامج واقتصادياته.

الإكثار الدقيق

يعكس التباين الطبيعى فى قدرة بعض النباتات على التكاثر الخضرى القدرة المذهلة لهذه النباتات على التضاعف. وتعتبر طريقة التكاثر الخضرى التى حبا بها الله سبحانه وتعالى كثيرا من النباتات الأساس العلمى للتكاثر الدقيق فى مزارع الأنسجة. وربما يصبح الإكثار الدقيق منافسا للإكثار التقليدى على الأقل فى بعض النباتات فيشير Rout *et al*., (2006) إلى الإكثار التجارى لـ ١٥٦ نوعا من نباتات الزينة وحدها. وتسيطر هولندا وكولومبيا وايطاليا وإسرائيل على ٨٠% من هذا الإنتاج والنسبة الباقية موزعة على دول العالم الأخرى. ويؤكد أن مشكلة ارتفاع أجور الأيدى العاملة فى الدول المتقدمة هى العائق أمام التطبيق الواسع لتلك التقنية. ومن ثم تقوم الشركات المتخصصة باستخدام الميكنة فى العديد من المراحل كإعداد الأجزاء النباتية وتحضير البيئة وفصل

وتصنيف النباتات المتكشفة وإعدادها بطريقة تسهل من نقلها وزراعتها. ورغم صعوبة إكثار العديد من الأشجار الخشبية فى مزارع الأنسجة بهذه التقنية فإن تقرير Dhawan & Saxena (2005) يشير إلى أن عدد الأشجار الخشبية التى تم زراعتها فى الهند بلغ حوالى ٣.٧ مليون شتلة من أشجار *Anogeissus pendula* و *Eucalyptus* spp و *Populus deltoids* وغيرها فى مساحة حوالى أربع الألف هكتار بعضها فى مناطق ذات ظروف قاسية. وقد أمكن بتعديل بيئات الزراعة التغلب على بعض المشكلات التى اكتشفت فى الحقل فى أشجار *Populus deltoides*.

يبدأ النمو الحديث الناتج من التكاثر الخضرى باختلاف أنواعه من الأنسجة الميرستيمية والتى تقع فى قمم السوق والجذور ومنطقة الكامبيوم فى الساق وكذلك نسيج الكالس. وبتفاعل المحتوى الوراثى للنبات وبعض العوامل الطبيعية والكيماوية الأخرى التى سبق شرحها يمكن دفع هذه الأنسجة الميرستيمية لتتكشف إلى سوق، وأوراق، وجذور أو أجنة جسدية. ويمكن أيضاً تحت بعض الظروف دفع بعض أنواع الخلايا غير الميرستيمية - غالباً الخلايا البرانشيمية - إلى استعادة حالتها السابقة كخلايا ميرستيمية والتى تمتاز بصغر حجمها وكبر حجم النواة وكثافة السيتوبلازم والقدرة على الانقسام وتكوين أنسجة جديدة مختلفة. ويوضح شكل رقم (٦-١) تحويل خلية برانشيمية من كالس نبات *Curcuma zedoaria* إلى برعم يتكشف لاحقا إلى ساق (Marcia *et al.*, 2001). وتسمى الجذور المتكونة على السوق أو الأوراق أو السوق الناتجة من الجذور أو الأوراق بالعرضية حيث أنها تكونت فى غير مكانها الطبيعى. والخلايا التى ترتد من حالة التكشف إلى عدم التكشف يمكنها تكوين الكالس والذى يعرف بكونه كتلة من الخلايا غير المتكشفة أو الخلايا البرانشيمية التى تتكون نتيجة لإحداث جرح والتى يلاحظ تكونها فى قواعد العقل وفى منطقه اتحاد الأصل بالطعم. وقد تتكشف الخلايا غير المتميزة فى مزارع الأنسجة إلى جذور، سوق، أوراق أو أجنة جسدية. وتعتبر قدرة الخلية النباتية

على إعادة تكوين نبات جديد وهو ما يسمى totipotancy من الصفات التى حبها الله للخلايا النباتية دون الحيوانية.

وبصفة عامة تتضمن عملية إكثار النباتات باستخدام زراعة الأنسجة فصل خلية أو نسيج أو عضو نباتى ودفعه تحت ظروف مناسبة لتكوين أعضاء جديدة (Debergh & Read, 1991). ومن ثم توجد عدة أنواع من زراعة الأنسجة اعتماداً على نوع النسيج المستعمل فى الزراعة كما سبق ذكره فى الفصل الأول، لكن حديثاً استخدم Hall (1999) و Neumann *et al.* (2009) مصطلح زراعة الخلايا cell culture لجميع صور الزراعة فى القوارير. ويوضح شكل رقم (٦-٢) الطرق العامة لإكثار نباتات البطاطس باستعمال زراعة الأنسجة. لكن ما هى مميزات الإكثار المعملي؟. كما سبق القول يعتبر الإكثار المعملى تطوير لطرق الإكثار الخضرى المعروفة لذا فإن له نفس مميزات الإكثار الخضرى علاوة على ما يلى:

١. يتطلب الإكثار المعملى استخدام جزء صغير جداً من أنسجة النبات. ولسهولة التحكم فى عوامل النمو من عناصر غذائية، وهرمونات، وعوامل طبيعية فإن معدل الإكثار يكون سريع ويساعد هذا على سرعة إكثار السلالات والأصناف الجديدة.

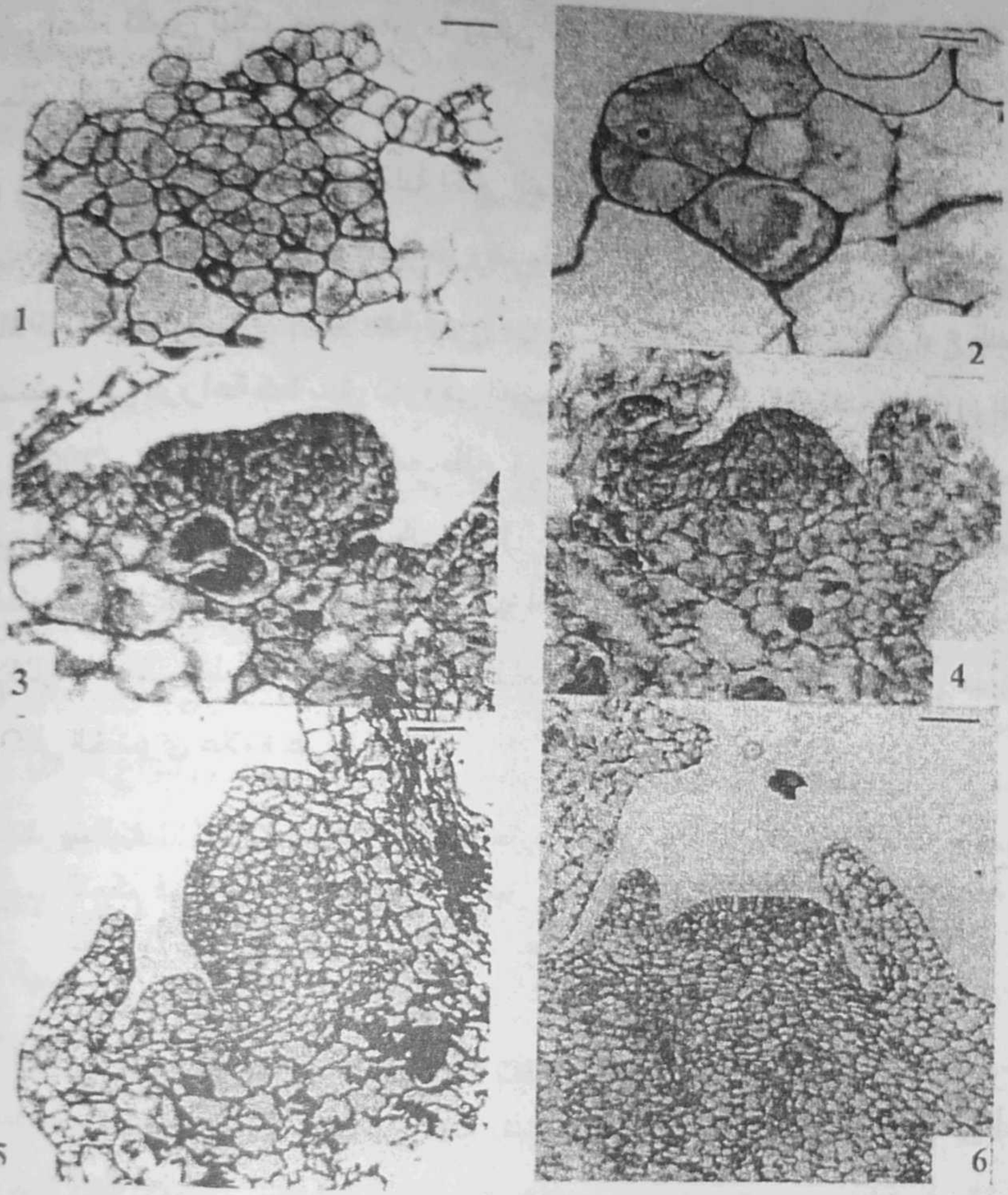
٢. تتم عملية الإكثار تحت ظروف معقمة وباستخدام نباتات خالية من الأمراض والمسببات المرضية لذا فإن النباتات الناتجة تكون خالية من الأمراض فى أغلب الحالات.

٣. تستخدم بنجاح لإنتاج نباتات خالية من الفيروس.

٤. إمكانية إنتاج بعض النباتات التى يصعب إكثارها بالطرق العادية سواء الجنسية أو الخضرية أو لكون هذه النباتات بطئيه النمو.

٥. تمتاز بعض النباتات الناتجة ببعض الصفات المرغوبة كزيادة التفريع فى الفراولة وبعض نباتات الزينة.

٦. إمكانية إنتاج النباتات على مدار العام وعدم التقيد بفصول السنة.



شكل ٦-١: قطاع طولى فى كالس نبات *Curcuma zedoaria* منزرع فى بيئة MS سائلة ومحفوظة فى الظلام. (١ ،٢) يوضحان بدء تكوين المناطق الميرستيمية بعد ١٠ أيام من الزراعة (المستقيم الموضح يمثل طول ٥٠، ٢٦ ميكروميتر على التوالي). (٣) الخلايا الميرستيمية المتكونة وقد احتوت على سيتوبلازم كثيف بعد ٢٠ يوم من الزراعة (المستقيم الموضح يمثل طول ١٩ ميكروميتر). (٤،٥) بداية تكوين برعم خضرى بعد ٣٠ يوم من الزراعة (المستقيم الموضح يمثل طول ٣٧ ،١٠٠ ميكروميتر على التوالي) (٦) قمة الساق المتكونة ويتضح الاتصال الوعائى بينها وبين الكالس (Marcia *et al*., 2001).

٧. سهولة حفظ النباتات الناتجة لمدة طويلة، ونقلها من مكان لآخر بسهولة.

٨. صغر المساحة المستغلة.

وعلى الرغم من هذه المميزات فإن من عيوب للإكثار باستعمال مزارع الأنسجة:

١. يحتاج إلى مهارات فنية عالية وأجهزة قد تكون مكلفة.

٢. اختلاف الطريقة المتبعة للحصول على أحسن نتائج باختلاف النباتات والظروف البيئة السائدة.

٣. صعوبة إكثار بعض النباتات خاصة الأنواع الشجرية وتباين القدرة على الإكثار الدقيق بين الأصناف التابعة لنفس النوع مع كثرة العوامل المؤثرة فى ذلك.

٤. قد تتصف النباتات الناتجة ببعض الصفات غير المرغوبة مثل كثرة التفريع وهى غير مرغوبة فى بعض النباتات. وقد لا تتكشف بعض هذه الصفات إلا بعد مدة طويلة كمرحلة الإزهار مثلاً.

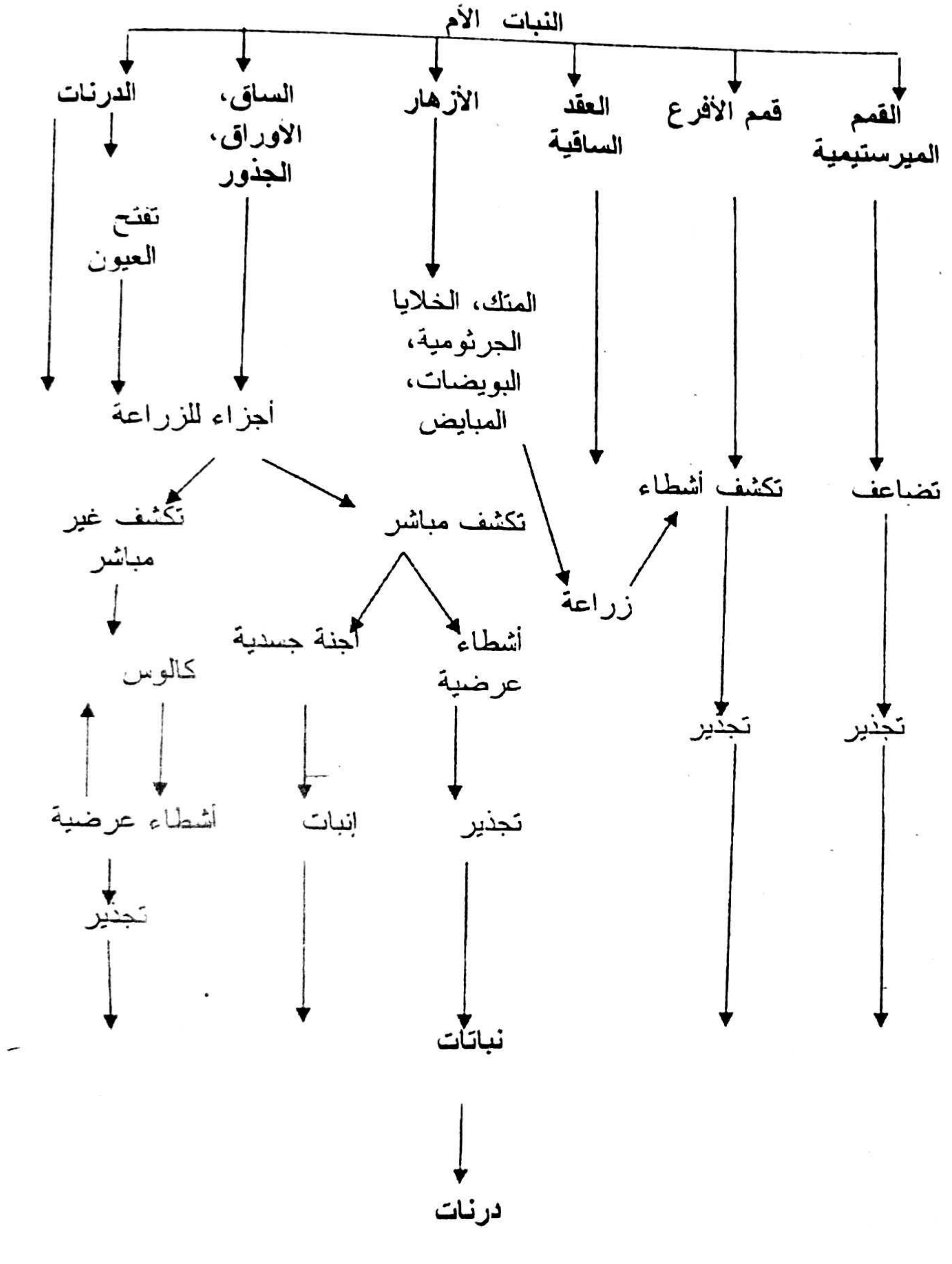
٥. تواجه عملية أقلمة ونقل النباتات من المعمل إلى الصوبة بعض الصعوبات التى قد تؤدى إلى موت بعضها.

٦. احتمال إنتاج نباتات مختلفة وراثياً عن النبات الأم.

٧. تفقد بعض المزارع قدرتها على التكشف باستمرار زراعتها معملياً.

طرق الإكثار المعملى

يتم الإكثار المعملى بطريقة مباشرة من النسيج أو العضو النباتى أو بعد تكوين الكالس وتعرف الطريقة الأخيرة بغير المباشر. وتقسم طرق الإكثار المعملى إلى طريقتين أساسيتين هما أ) نمو الأفرع من البراعم الطرفية أو الجانبية أى من البراعم سابقة التكوين على النبات الأم. ب) تكوين الأفرع العرضية أو الأجنة الجسدية من أجزاء نباتية مختلفة. وتتم عملية التكشف غالباً فى ثلاثة مراحل منفصلة اعتماداً على العوامل السابق ذكرها خاصة منظمات النمو والتى تؤثر على المزرعة. المرحلة الأولى



شكل ٦-٢: الطرق العامة لإكثار نباتات البطاطس بإستعمال زراعة الأنسجة (Jones, 1991) .

هى إعادة الخلية إلى مرحلة عدم التكشف لكى تعاود الانقسام. والمرحلة الثانية هى تنشيط المحتوى الوراثى للخلايا المؤهلة للتكشف وتكوين العضو النباتى أما المرحلة الأخيرة فهى نمو الأعضاء المتكشفة. وقد قسم Munetaka (1999) المرحلة الأولى إلى تحت مرحلتين الأولى هى اكتساب الخلية القدرة على التكشف إلى أشطاء أو جذور والثانية حدوث التكشف. وبالفعل تم تحديد تلك المراحل معملياً بالطرق الفسيولوجية وبالفحص المظهرى لبعض الطفرات التى ينقصها القدرة على التكشف كتغيير اللون. وفى بعض النباتات أمكن تحديد جينات تلعب دوراً هاماً فى إعادة التكشف بالتحليل الوراثى وتم فعلاً عزل بعضها مما ساهم فى فهم بعض عمليات التطور فى النبات.

أولاً: إكثار النباتات عن طريق قمم الأفرع والبراعم الجانبية

تعتبر هذه الطريقة من أكثر الطرق شيوعاً لإنتاج نباتات مشابهه للنبات الأم وتعتمد هذه الطريقة على تنشيط البراعم الموجودة أصلاً على الجزء المفصول من القمم النامية أو من عقدة واحدة أو جزء من الساق مكون من عدة عقد. وعندما تنشط البراعم الجانبية وتصل لطول مناسب يتم استخدامها لإنتاج أفرع جديدة بتكرار تقسيمها وزراعتها مرة أخرى. وعندما نصل للعدد المناسب من الأفرع تدفع لتكوين جذور ثم تنقل إلى الصوبة. ويكون طول الجزء المنزرع فى حدود ١-٢ سم من قمم الأفرع الجانبية أو الفرع الرئيسى، ويمكن استخدام جزء أطول حيث أنه يحمل عدد أكبر من البراعم ليزيد عدد النباتات المتكشفة. وللجزء الكبير قدرة أعلى على تحمل التعقيم السطحى وبذلك تزيد نسبة نجاح زراعته. بالإضافة إلى ذلك فإن نمو الجزء الكبير يكون أسرع من الجزء الصغير لكن يعاب على استعمال جزء نباتى كبير الحجم صعوبة تعقيمه. وقد أمكن بهذه الطريقة إكثار عدد كبير من نباتات الزينة والموز ونخيل البلح والعديد من المحاصيل المختلفة حيث يمكن مضاعفة أعداد النباتات مئات المرات فى مدة وجيزة ففى إحدى التقديرات النظرية لإكثار نبات الدخان أمكن الحصول على حوالى مليون نبات خلال ستة

أشهر باستخدام جزء نباتى واحد. ويتوقف معدل الإكثار على عدد البراعم الموجودة على الجزء المنزرع. وفيما يلى شرح لهذه الطرق.

١. زراعة القمم الميرستيمية وإنتاج نباتات خالية من الفيروس

وتصنف هذه الطريقة كطريقة مختلفة عن زراعة القمم النامية والعقد الساقية ذات البرعم الواحد أو عديدة البراعم، إلا أنها تعتمد أيضاً على وجود القمة الميرستيمية المتكونة أصلاً على النبات الأم. وكان من المعتقد أن التكاثر الجنسى يعتبر وسيلة لتفادى نقل الأمراض الفيروسية من الأم المصابة إلى النسل لكن أصبح من المؤكد الآن أن بعض الفيروسات تنتقل عن طريق البذور وبنسبة عالية جداً قد تصل إلى ٢٥% (Córdoba-Sellés *et al*., 2007). ويعنى ذلك أن التكاثر الجنسى لبعض النباتات ربما يساعد على انتشار الإصابة الفيروسية. وقد كان نجاح Morel (1960) مذهلاً حيث استطاع الحصول على عدة آلاف من نباتات الاوركيد المعروفة بصعوبة إكثارها فى سنة باستعمال قمة ميرستيمية واحدة. والآن يتم استخدام زراعة القمم الميرستيمية على نطاق تجارى وبنجاح فى إنتاج الكثير من النباتات كالبطاطس (Jones, 1988)، والفراولة، والقرنفل، والموز والعديد من نباتات الزينة (Rout *et al*., 2006) الخالية من الأمراض الفيروسية والفطرية والبكتيرية. ولهذا أهمية كبرى فى المحاصيل التى يعتمد إنتاجها على الإكثار الخضرى مثل الموز (شكل رقم ٦-٣)، اعتماداً على كون القمم الميرستيمية للنباتات المصابة خالية أو محتوية على أقل تركيز من الفيروس، وقد يرجع هذا إلى:

١. معدل انقسام الخلايا فى القمم الميرستيمية أعلى من معدل إصابتها بالفيروس.

٢. النشاط الأيضى فى الخلايا الميرستيمية عالياً بدرجة تعيق دخول الفيروس إليها. وربما يعزى ذلك إلى إنتاج الخلية لبعض المواد التى من شأنها إعاقة العدوى.

٣. قد يثبط التركيز العالى من السيتوكينينات فى الخلايا الميرستيمية نشاط الفيروس.



حجم ميرستيمات

النباتات الناتجة من نمو الميرستيمات

الميرستيمات بعد شهر من نقلها للبيئة

الميرستيمات بعد نقلها للبيئة الجديدة مباشرة

نبات كامل جاهز للنقل والأقلمة

نبات بعد أسبوع من الأقلمة

شكل ٦-٣: مراحل إكثار الموز الخالى من الأمراض عن طريق زراعة الأنسجة حتى مرحلة الزراعة فى الأرض المستديمة بمركز الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية – كلية الزراعة – جامعة المنيا – مصر.

٤. عدم اكتمال نمو الأنسجة الوعائية فى القمم الميرستيمية وبذلك يكون انتقال الفيروس خلال خيوط البلازمودزماتا بطئ.

وبصرف النظر عن سبب خلو الخلايا الميرستيمية من الإصابات الفيروسية فإن العلماء اتجهوا إلى دراسة إمكانية إنتاج نباتات خالية من الفيروس ببعض المعاملات التقليدية بمفردها أو بالدمج مع زراعة الأنسجة كزراعة القمم الميرستيمية أو البراعم الجانبية (Valero *et al.*, 2003). وقد تمكن Nascimento *et al.* (2003) من دمج عدة طرق مع زراعة الأنسجة للحصول على نباتات بطاطس خالية من الفيروسات. ومن هذه الطرق:

١. المعاملة الحرارية أو ببعض المركبات التى تعيق انقسام الفيروس.

٢. فصل وزراعة القمم الميرستيمية.

٣. المعاملة الحرارية ثم فصل وزراعة القمم الميرستيمية.

٤. تكشف الأفرع العرضية من نباتات مصابة متبوعا بفصل وزراعة القمم الميرستيمية.

٥. تعريض النبات الأم لفترة إظلام ثم فصل وزراعة القمم الميرستيمية.

٦. الحصول على خلايا ميرستيمية من الكالس أو البروتوبلاست.

يلاحظ من العرض السابق مدى أهمية فصل وزراعة القمم الميرستيمية فى إنتاج نباتات خالية من الفيروس. ويتم ذلك بفصل أجزاء صغيرة جداً من القمم القمة الميرستيمية طولها عادة ٠.١ مم وقطرها حوالى ٠.٢٥ مم. ويتم الفصل تحت المجهر وبدقة متناهية لتجنب إحداث ضرر بالقمة. ويكون المُستأصَل النباتى على شكل حرف V بطول ٠.٣-٠.٥ مم بحيث تحتوى على منشآت الكامبيوم الذى يزيد من نسبة نجاحها. وكذلك يجب أن يتضمن المُستأصَل النباتى واحد أو اثنين من مبادئ تكوين الأوراق وهو ما يشير إلى الثبات الوراثى فى النباتات الناتجة لأنها ستتكشف من أنسجة متكشفة على

النبات الأم وليس من براعم تكونت عقب ذلك. ويضيف Grout (1999) ضرورة استبعاد أى أنسجة وعائية من المُستأصَل النباتى لتفادى وجود الفيروس. ويبين Dale & Cheyne (1993) العلاقة بين حجم الميرستيم وعدد النباتات التى يمكن الحصول عليها ومدى خلوها من فيروس MCMV فى نباتات البرسيم الحجازى فى جدول رقم (٦-١). وتؤخذ القمم الميرستيمية من النباتات متساقطة الأوراق عقب الخروج من دور السكون مباشرة، أما تلك المستديمة الخضرة فالوقت المناسب هو موسم النمو لعلاقة ذلك بنشاط الفيروس بالقمة الميرستيمية. يزرع المُستأصَل فى وسط يشجع النمو وتكوين أفرع خالية من الإصابة. وبعدها يمكن إكثار الأفرع الناتجة بأى طريقة أخرى كمزارع القمم النامية أو العقد الساقية.

جدول ٦-١: العلاقة بين حجم الميرستيم القمى وعدد نباتات البرسيم الحجازى التى يمكن أقلمتها ومدى خلوها من فيروس MCMV كما وجدها Dale & Cheyne (1993).

حجم المُستأصَل مم	عدد المُستأصَلات المنزرعة	عدد النباتات التى تم أقلمتها	عدد النباتات السليمة
أقل من ٠.٦	٩٠	١٨	١٨
٠.٦-١.٢	١١٣	٤٥	١٩
١.٣-١.٨	١٩٠	١٠٢	٢٥
١.٩-٢.٤	١٥٨	١٥٨	١١
٢.٥-٣.٠	١٧٤	١٧٤	١١

ولابد أن تتم عملية الفصل والزراعة بسرعة حتى لا تموت الأجزاء المنفصلة بسبب الهواء المتدفق من كابينة الزراعة أو حرارة الضوء المستعمل. ويفضل استعمال مجهر مزود بالضوء البارد أو استعمال الألياف الزجاجية لنقل الضوء لمسرح العمل (Bhojwani & Razdan, 1996). تنقل الأفرع المتكشفة بعد ذلك إلى بيئة لتشجع نمو الجذور. وكان Morel & Martin أول من تمكنا بنجاح من استخدام هذه الطريقة للحصول على نباتات Dahlia خالية من الفيروس فى سنة ١٩٥٢. لكن من الناحية التطبيقية يصعب فصل هذا الجزء الصغير جداً دون حدوث ضرر يمنع نموه. ورغم

سهولة الزراعة فى بيئة شبه صلبة إلا أن الزراعة فى بيئة سائلة مع تدعيم الجزء المنزرع فوق ورق ترشيح كركاب علي شكل حرف m عادة ما يحسن من النمو. ويلاحظ أن فرصة تكوين الأفرع تزداد بزيادة حجم الجزء المنزرع لكنه قد يكون غير خالى من الفيروس، أما الأجزاء الصغيرة الحجم فغالباً ما تتجه إلى تكوين كالس أوجذور فقط. وغالباً يتكون الكالس من الخلايا المصابة أثناء العمل. ويجب عند ملاحظة تكوين الكالس التخلص منه فى أقرب فرصة لتفادى التغييرات الوراثية بسبب التكشف العرضى للبراعم. حيث يؤكد Grout (1999) وجود تباين فى المشابهات الإنزيمية بين النباتات الناتجة من الكالس وتلك المتكونة من القمم الميرستيمية مما قد يوحى بوجود اختلافات وراثية. وذلك على الرغم من عدم وجود اختلافات بين النباتات من حيث محتوى الخلايا من DNA واختلاف الطرز المظهرى للنباتات الناتجة من الكالس. ومن ثم فإنه يفضل فصل القمة بطول حوالى ١ مم وقطر ٥ مم، وفى الغالب تنتج هذه القمة الميرستيمية نباتات خالية من الفيروس، مع ضرورة اختبار خلو النباتات الناتجة من الفيروس قبل إعادة إكثارها معملياً.

هناك صعوبة فى تعقيم النباتات المتوردة rosette والتى تمتاز بتقزم الساق فتبدو الأوراق وكأنها خارجة من منطقة واحدة تقريباً معطية شكل وردة وغالباً ما يحدث استطالة سريعة للساق عند الإزهار. ولكى نضمن الحصول على نباتات خالية من التلوث يفضل فصل القمم النامية وزراعتها فى بيئة غنية بالمواد المشجعة لنمو الكائنات الدقيقة مثل الببتون ومستخلص الخميرة لضمان عدم وجود تلوث داخلى. ويضاف إلى هذه البيئة بعض الهرمونات للعمل على استطالة الأفرع لتسهيل صل القمة الميرستيمية وزراعتها بعد ذلك. تكون بعض خلايا الكالس المتكون من الأنسجة المصابة بالفيروس غير مصابة وتتكشف عنها نباتات سليمة. إلا أن الميرستيمات المتكونة تكون غير مضمونة الخلو من الفيروس كتلك الناتجة من زراعة الأنسجة الميرستيمية، وتزيد نسبة الخلايا غير المصابة إذا أخذ الجزء المنزرع من القمم الميرستيمية، وربما يرجع ذلك إلى سرعة انقسام

الخلايا. ويمكن الرجوع إلى George (1993) و Grout (1999) للمزيد من المعلومات عن دور وكيفية استخدام زراعة القمم الميرستيمية للحصول على نباتات خالية من الفيروس.

٢. زراعة القمم النامية

يعتبر Robbins أول من استطاع فصل قمة ساقية من نباتات البسلة والذرة والقطن بطول ٣ مم تقريباً ونجح فى زراعتها فى المعمل وكان ذلك سنة ١٩٢٢. لكن لسوء الحظ وبسبب تحضين المزرعة فى الظلام لتشجيع تكوين الجذور كانت الأفرع النامية صفراء ذات مجموع جذرى كبير نسبياً لكنها ماتت بعد ذلك. ولم يحدث تقدم كبير خلال العشرين عاما التالية لهذه المحاولة إلى أن استطاع White فى سنة ١٩٣١ فصل وزراعة قمة ميرستيمية بطول١.٠ مم من *Stellaria spp* ولاحظ تكوين بدايات الأوراق على الجزء المنزرع خلال ستة أسابيع من الزراعة. وكانت بداية نجاح استخدام هذه الطريقة كطريقة للإكثار الدقيق على يد العالم Loo فى سنة ١٩٤٥ حيث زرعت القمم النامية بطول ٥-١٠مم لنباتات الأسبرجس فى بيئة سائله مع تدعيم النمو على صوف زجاجى، وقد أوضح الملاحظات الآتية:

١. تتوقف سرعة النمو على تركيز السكر المضاف إلى البيئة.
٢. يمكن استخدام الآجار بتركيز ٠.٥% بدلاً من الصوف الزجاجى.
٣. أمكن استمرار نمو وتقسيم ونقل المزرعة إلى بيئة جديدة لمدة ٢٢ شهر.

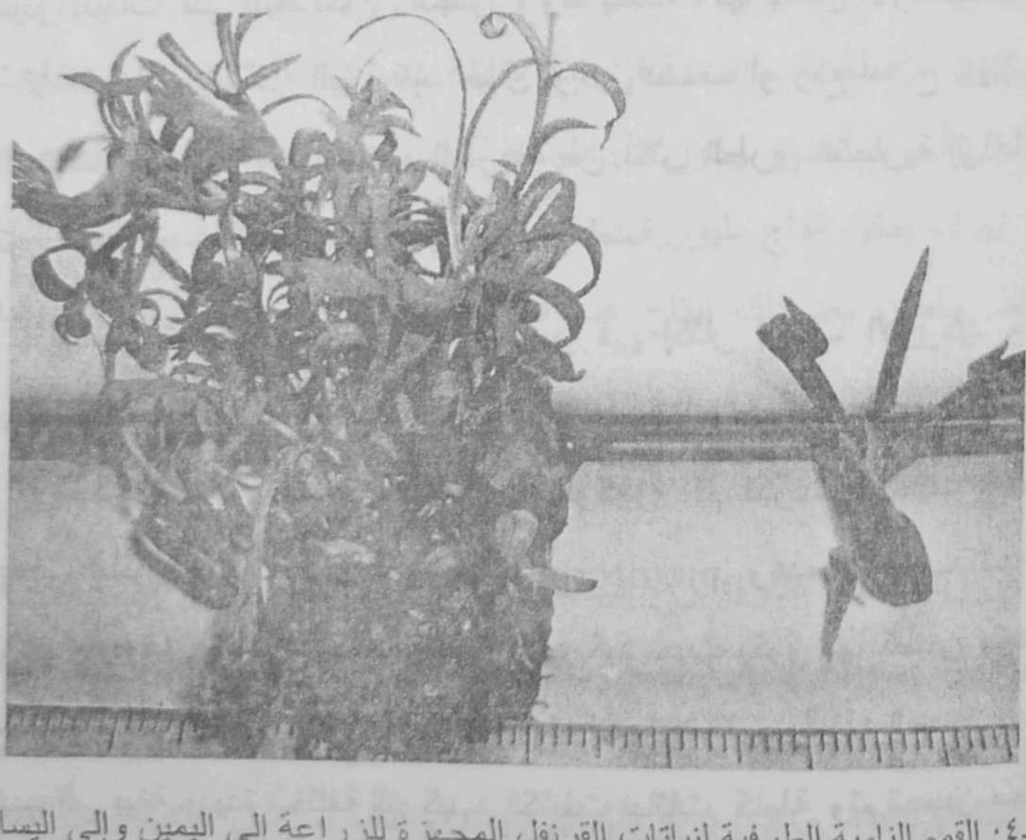
لكن لسوء الحظ أيضاً لم يستطيع Loo تكوين جذور على الأفرع النامية. لكن فى عام ١٩٤٦ نجح Ball فى إنتاج نباتات من زراعة القمم النامية لنباتات *Lupinus polyphyllus* وأمكن نقل هذه النباتات إلى الحقل. وفى عام ١٩٦٣ تمكن Morel بنجاح من إكثار نباتات *Cymbidium* بزراعة القمم النامية فى البيئة التى كانت تستعمل لزراعة البذور. وكان لأبحاث Murashige & Skoog الفضل فى تطوير علم زراعة

الأنسجة عموما وزراعة القمم النامية خاصة عندما توصلا إلى تركيب بيئة MS. كما ساهم اكتشاف السيتوكينينات ودورها فى كسر السيادة القمية فى استخدام زراعة القمم النامية لإكثار بعض النباتات. ومن العوامل التى شجعت استخدام هذه الطريقة للإكثار إمكانية استعمالها مع عدد متباين من النباتات وبمعدل إكثار عالى، بالإضافة الى امكانية الحصول على نباتات خالية من الفطريات، وإنتاج نباتات مشابهة للأم. لكن قد يسبب استعمال السيتوكينينات بهدف تكوين المزيد من البراعم العرضية استحداث بعض الطفرات الوراثية. فعلى سبيل المثال زرعت القمم النامية لنباتات الموز الحساسة للإصابة بفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* فى بيئة تحتوى على السيتوكينين. تم إعادة تقسيم وزراعة النباتات الناتجة لسبع دورات للحصول على ٢٠.٠٠٠ نبات، تم تقيمها فى الحقل انتخب منها ستة نباتات مقاومة للفطر بدرجة عالية لكن كانت ذات إنتاجية ضعيفة. وبإعادة إكثارها فى القوارير أمكن انتخاب ثلاث طرز مقاومة للفطر وذات إنتاجية مساوية للنباتات الأم (Bhojwani & Razdan, 1996).

طريقة زراعة القمم النامية

فى معظم النباتات العشبية يمكن البدء باستخدام القمم النامية للساق الرئيسى أو الأفرع الجانبية على أن تتضمن المنطقة الميرستيمية وجزء من الساق يحتوى على بدايات الأوراق ويصل طولها إلى ٢ سم تقريباً. وفى بعض النباتات كالكافور يمكن أن يتضمن الجزء المنزرع برعم أو برعمين، وعموماً يفضل استعمال مُستاصلات نباتية كبيرة الحجم لأنها أسرع فى النمو مع معدل بقاء أعلى وتكثيف عدد أكبر من النباتات لوجود عدد أكبر من البراعم العرضية ويطلق George & Debergh (2008) على المزرعة فى هذه الحالة مزارع الأشطاء shoot culture. ويجب ألا يحدث خلط بين هذه الطريقة فى حالة استخدام جزء يحتوى على براعم والطريقة التالية هى زراعة العقد الساقية. ولما كانت البراعم المأخوذة من الأشجار تتأثر غالبا بفترة أخذها كان تكون فى

طور سكون فإنه يجب اختيار الميعاد المناسب بحيث لا تكون البراعم فى طور راحة أو ستدخله قريباً، وكما سبق يفضل دائما أخذ البراعم والأشجار فى مرحلة ما قبل البلوغ الجنسى. وإذا كانت البراعم المأخوذة من نباتات نامية فى الحقل فى طور سكون فإنه يمكن كسر هذا السكون فى المعمل إما بالمعاملة بالحرارة المنخفضة من صفر إلى ١٢°م أو بزيادة فترة الإضاءة إلى ١٦ ساعة فى اليوم مع خفض درجة الحرارة Arora (2003). وتعطى القمم النامية المفصولة من البادرات النامية من بذور معقمة على بيئة مغذية نتائج أفضل. وعندما نحصل على كتلة من الأفرع فى المعمل كما فى الشكل رقم (٦-٤) كنتيجة لاستعمال تركيزات عالية من السيتوكينينات يعاد تقسيم هذه الأفرع وزراعتها مرة أخرى فى البيئة. ولا يفضل فى هاتين المرحلتين الاقتصار على زراعة القمم النامية فقط بل يتم استخدام القمم النامية بالإضافة إلى البراعم الجانبية كما فى الطريقة التالية.



شكل ٦-٤: القمم النامية الطرفية لنباتات القرنفل المجهزة للزراعة إلى اليمين وإلى اليسار يتضح تكشف عدد كبير من الأشطاء نتيجة استعمال السيتوكينين.

يختلف طول الأفرع المتكشفة فى مزارع القمم النامية باختلاف الأنواع النباتية وتركيز منظمات النمو فى البيئة فقد تكون الأفرع متقزمة للغاية ولا يمكن تقسيمها ولا تستطيل كما فى القرنفل (شكل رقم ٦-٥) رغم استعمال تركيز ٢ ملجم/لتر فقط من BA. وعند الحصول على أفرع لها سلاميات واضحة فإنها تقسم إلى عقل صغيره ثم تدفع إلى الاستطالة بتغير تركيز ونوع منظمات النمو. أما النباتات المتوردة حيث لا يستطيل ساقها يكون من الصعب فصل أفرع فردية من الأفرع المتكشفة فيتم تقسيم كتلة الأفرع المتجانسة إلى عدة أجزاء يحتوى كل جزء منها على عدد من الأفرع ويتم زراعتها من جديد. وتكون هذه الطريقة مثالية فى حالة الرغبة فى إنتاج نباتات كثيفة النمو الخضرى كما فى بعض نباتات الزينة. أو يتم دفع الأفرع إلى الاستطالة باستعمال بعض منظمات النمو مثل الجبريلين، بالإضافة إلى خفض الكثافة الضوئية أو الإظلام. وعندما نحصل على عدد كافى من الأفرع تنقل بعد ذلك إلى بيئة التجذير. وهذه البيئة لابد أن تكون خالية من السيتوكينينات التى تثبط تكوين الجذور، وقد يضاف لها بعض الأوكسينات أو يخفض تركيز الأملاح المعدنية فى البيئة كإستعمال تركيز نصف أو ربع أملاح MS خاصة فى حالة النباتات الخشبية. وتعتبر هذه الطريقة من أكثر الطرق التجارية إتباعاً فى إكثار النباتات العشبية بصفة عامة والأشجار بصفة خاصة.

استخدمت هذه الطريقة بنجاح كبير فى إكثار نباتات الأوركيد حيث لاحظ Moral فى سنة ١٩٦٤ تكوين كالس من القمم النامية الموضوعة على بيئة شبه صلبة من الآجار وبعض الأملاح المعدنية وسكر الجلوكوز. ثم تكونت تراكيب صغيرة تشبه الكوريمات أطلق عليها مبادئ الكوريمات protocorm. وهذه التراكيب تشبه تلك التى تتكون فى ظروف الإكثار العادية لنبات الأوركيد حيث يكون لها قطبين محددين لكنها غير خضراء اللون ولا تختزن كربوهيدرات لأنها لا تقوم بالبناء الضوئى. وبنقل هذه التراكيب إلى بيئة جديدة مختلفة التركيب تكشفت نباتات كاملة. وتم تحسين معدل تكوين



شكل ٦-٥: الأشطاء المتقزمة لنباتات القرنفل بسبب استعمال تركيز عالى من السيتوكينين فقط (فى اليسار)، وعلى اليمين الأشطاء وقد استطالت عقب الزراعة فى بيئة تحتوى على أحد الأوكسينات فقط.

هذه التراكيب بوضع القمم النامية فى بيئة سائلة متحركة حيث تفتت ميرستيمات هذه التراكيب إلى أجزاء أصغر وكون كل منها تراكيب جديدة مماثلة. وينقل Neumann *et al.* (2009) أنه يمكن إنتاج مليون نبات *Cymbidium* بزراعة قمة واحدة فى فترة تسعة أشهر فقط. وأمكن بعد ذلك إنتاج هذه التراكيب من زراعة الأنسجة الورقية لنبات الأوركيد.

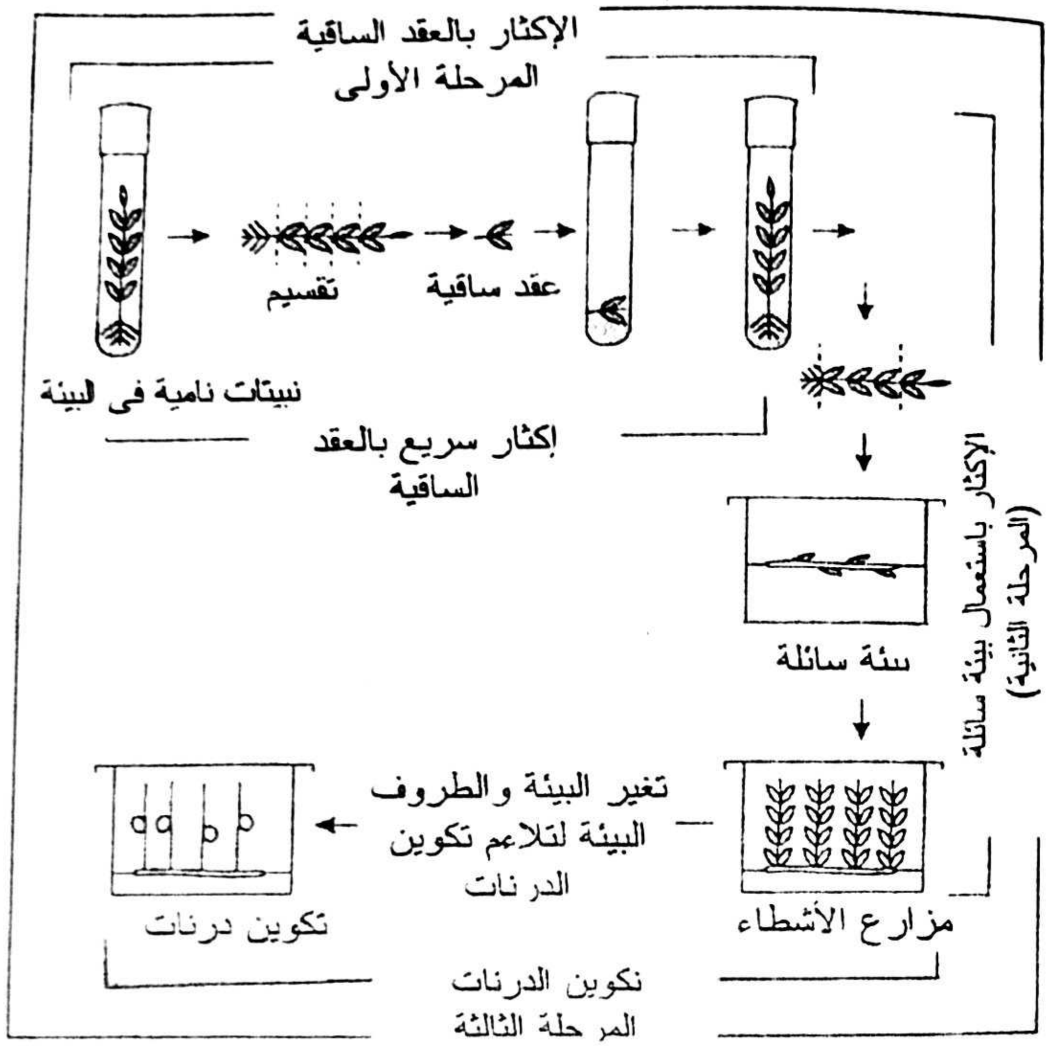
تنظيم تكوين الأفرع

يتوقف نمو وتضاعف عدد الأفرع الجانبية فى مزارع قمم الأفرع على وجود منظمات النمو فى البيئة خاصة السيتوكينينات، حيث يضمن ذلك تثبيط السيادة القمية مما يدفع البراعم للنمو. وقد تنجح إزالة القمم النامية فقط أو مع استعمال الهرمونات فى تثبيط السيادة القمية (Bhojwani & Razdan, 1996). وغالباً تستعمل عملية قرط القمم النامية عند استخدام الأفرع الموجودة فى المزرعة لزراعتها مرة ثانية وفى بعض الأنواع

الخشبية مثل Acer و Betula و Malus يزيد معدل تكوين الأفرع عند إزالة القمم النامية مع وضع الأفرع التى بها برعمين أو ثلاثة افقياً على سطح البيئة (Thrope *et al*., 1991 و (Harry & Thorpe, 1999). لكن وجد أن إزالة القمم النامية المعاملة بالسيتوكينينات لم تكن فعالة لتثبيط السيادة القمية فى نبات Yucca لكن أمكن الحصول على أفرع جانبية عندما شقت القمم النامية طولياً قبل زراعتها. ولسوء الحظ الأفرع الناتجة فى حالة زراعة قمم الأفرع لا تكون كلها ناتجة من براعم جانبية. حيث أن بعضها يتكون من براعم عرضية تكونت على الأجزاء المنزرعة مباشرة أو تكونت بطريقه غير مباشرة من الكالس الذى يوجد بوضوح فى قاعدة قمم الأفرع المنزرعة. ويصعب فى بعض الأحيان التفريق بين مصدر هذه الأفرع. ويمكن بالفحص التشريحى الدقيق التفريق بين ما إذا كانت الأفرع ناتجة من براعم عرضية أو جانبية. وإن كان هناك حاجة للمزيد من الأفرع العرضية يمكن تقسيم القمم النامية إلى أجزاء صغيرة وإعادة زراعتها. ويجب الحد من أو منع تكوين الأفرع العرضية بالتحكم فى مستوى الهرمونات المستعملة فى بيئة النمو لإنتاج نباتات مشابهة للأم.

٣. زراعة العقد الساقية

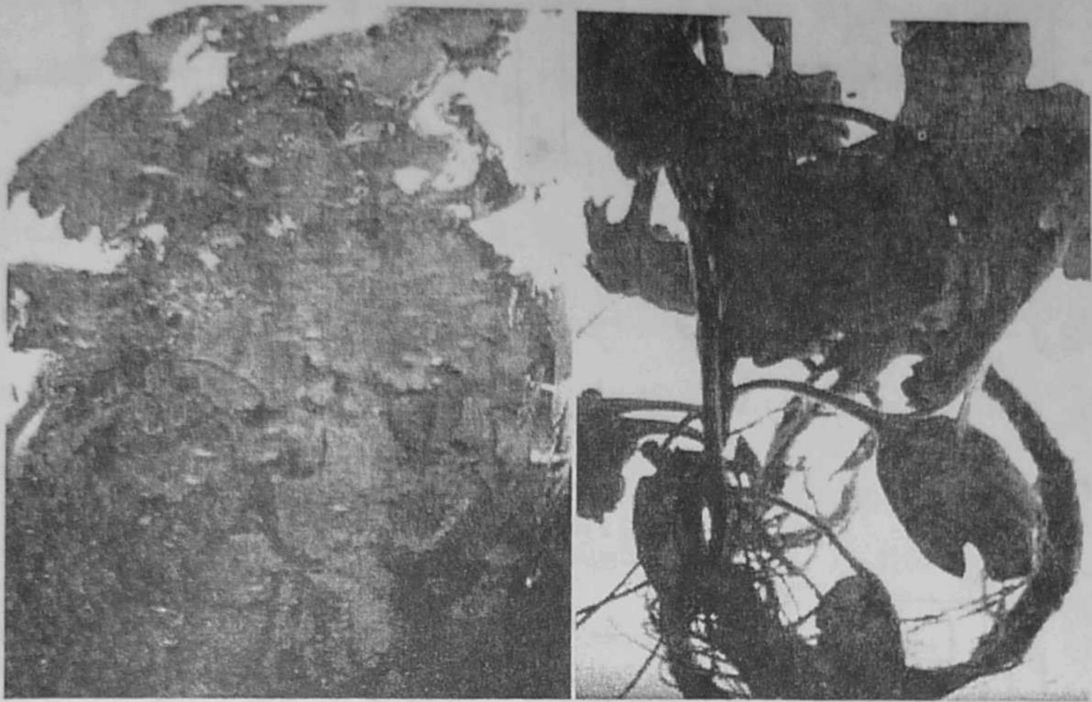
بدأت أسس استعمال طريقة تشجيع الأفرع الجانبية على النمو واستخدامها لإكثار بعض النباتات عام ١٩٢٥ وكان ذلك قبل اكتشاف السيتوكينينات حيث أمكن كسر السيادة القمية بإزالة القمم الطرفية مما شجع على نمو البراعم الإبطية. وكانت أول محاولة لعزل وزراعة برعم وتكوين جذور على الأفرع النامية من نبات الأسبرجس بواسطة Galston فى سنة ١٩٤٧. لكن كانت عملية التجذير صعبة فتم استعمال NAA وحفظت الأفرع بعد المعاملة فى الظلام مع استعمال بيئة سائله لتكوين الجذور ولكن ظلت عملية التجذير غير ممكنة. وتعتبر طريقة زراعة العقد الساقية مشابهة للطريقة السابقة من حيث استخدام براعم سابقة التكشف والجزء المنزرع عبارة عن جزء من الساق يحمل برعم واحد لكنه ليس طرفياً كما فى الشكل رقم (٦-٦).



شكل ٦-٦: إكثار البطاطس بالعقد الساقية لاحظ عدم استعمال البرعم الطرفى (George, 1993).

وتعتبر هذه الطريقة من أكثر الطرق المتبعة لإنتاج نباتات مشابهة للأم وهى تحاكى الطريقة التقليدية لزراعة العقل لكن بالطبع مع إمكانية الحصول على عدد كبير جداً من العقل طول العام (Bhojwani & Razdan, 1996). وعند استخدام القمم النامية يكون طول الجزء المنزرع حوالى ٢ سم وبعد استطالة الجزء المنزرع فى بيئة الزراعة وتكوين عدة عقد واضحة فيما يعرف بمرحلة الاستطالة. يتم وضع السوق الناتجة افقياً على سطح البيئة ويسمى ذلك بالترقيد المعملى، أو يقسم الساق إلى عدة أجزاء كل منها يحتوى على عقدة ساقية واحدة ثم تزرع كل عقلة فى بيئة جديدة مع ملاحظة إزالة

الأوراق الموجودة. ويتم تكرار ذلك عدة مرات للحصول على عدد من الأفرع يتم دفعها للتجذير بعد ذلك (شكل رقم ٦-٧).



شكل ٦-٧: فى اليسار مزرعة للعقد الساقية لنباتات *Chrysanthemum* ويلاحظ تكشف عدد كبير من الأشطاء ، وفى اليمين النباتتات بعد مرحلة التجذير وقبل النقل للبيت المحمى.

ليس هناك فرق كبير فى مكونات البيئة المستخدمة فى زراعة العقد الساقية والقمم النامية ويختلف فقط تركيز ونوع منظمات النمو المستعملة والتى تختلف على حسب النوع النباتى. وغالباً يكون التركيز المضاف من منظمات النمو منخفض حتى لا يشجع تكوين براعم عرضية. وفى بعض الحالات كما اتبع فى نبات *Chrysanthemum* يمكن زراعة العقد الساقية دون إضافة أى منظمات نمو للبيئة. ومن عيوب هذه الطريقة قلة عدد النباتات المتكشفة مقارنة بزراعة القمم النامية لكن يميزها انخفاض معدل الحصول على نباتات غير مشابهة للنبات الأم، بمعنى أن معدل حدوث التغيرات الوراثية يكون مرتفع فى زراعة القمم النامية بالمقارنة مع زراعة العقد الساقية (George, 1993). ويذكر Bhojwani & Razdan (1996) أن ظاهرة الكيميرا تكون أعلى فى حالة

استخدام العقد الساقية ويرجع ذلك إلى تكوين البراعم العرضية فيعاد توزيع الأنسجة ذات التركيب المختلف فى النبات الأم وبالفعل تم تكشف نباتات تفاح مختلفة من حيث لون الثمار عقب تكوين البراعم العرضية مباشرة أو غير مباشرة من الكالس. لكن هناك تباين كبير فى هذه الظاهرة ويخضع ذلك للنوع النباتى، لذا يفضل العمل على عدم تكوين كالس باستخدام تركيز عالى من السيتوكينينات (Cassells *et al.*, 1980). وتستخدم هذه التقنية الآن لإكثار عدد من النباتات العشبية من ذوات الفلقة الواحدة والفلقتين والأشجار الخشبية. وتستخدم هذه الطريقة على نطاق تجارى لإكثار عدد من النباتات مثل *Solanum tuberosum, Vitis, Salix babylonica, Araucaria,Hedra helix* وتوجد طريقة أخرى مشابهة لهذه الطريقة تعتمد على استعمال جزء من الساق يحمل أكثر من برعم جانبى بعد إزالة البرعم الطرفى لكسر السيادة القمية ثم يزرع هذا الجزء فى البيئة فتنمو البراعم. وقد تستعمل تركيزات عالية من السيتوكينينات للمساعدة فى كسر السيادة القمية وتنشيط البراعم. وبعد ذلك يتم دفع الأفرع للاستطالة ثم التجذير. وعموما يتباين التركيز الأمثل من السيتوكينينات طبقاً للنوع النباتى ومرحلة نموه الفسيولوجية، وتستعمل هذه الطريقة لإكثار بعض النباتات مثل الفراولة والقرنفل والجربيرا.

يتضح من ذلك أنه للحصول على عدد كبير من الأشطاء يصبح من الضرورى تشجيع نمو البراعم الجانبية وتتفاوت قدرة الطرز الوراثية المختلفة فى تحفيز نمو هذه البراعم، أو بمعنى آخر مدى وجود السيادة القمية. فبعض الطرز ينتج عدد قليل من الأفرع الطويلة والبعض الآخر ينتج عدد كبير من الأفرع الجانبية. وقد يرجع السبب فى عدم نمو البراعم الجانبية إلى محتواها الزائد من الأوكسين أو لوجود عدد أكبر من المستقبلات الأوكسينية. وبالرغم من أن السيتوكينينات تعمل على كسر السيادة القمية إلا أن هناك طرق أخرى مثل إزالة القمة النامية بطريقة آلية ووضع الأفرع افقياً على سطح البيئة، أو استعمال بعض المواد الكيماوية لهذا الغرض، فقد وجد أن رش النباتات بمركب Dikegulac يشجع نمو البراعم الجانبية وتستخدم هذه المادة تجارياً لإنتاج نباتات

Azalia كثيفة النمو. وبإضافة تركيز ٥٠٠-١٠٠٠ ملجم/لتر من Sodium dikegulac إلى بيئة نمو مزارع الأشطاء فى الكريز الحلو لوحظ زيادة معنوية فى عدد الأشطاء المتكونة (George & Debergh, 2008) .

٤. تكوين الأفرع من البذور

فى بداية الثمانينيات من القرن الماضى استخدمت البذور لإنتاج الأفرع مباشرة حيث عقمت البذور وزرعت فى بيئة تحتوى على تركيز عالى من منظمات النمو وبمجرد الإنبات لوحظ تكوين عدد من الأفرع، وقد قدر نظرياً إمكانية إنتاج ١٠ مليون فرع خلال عام من بذرة اللوز(George & Debergh, 2008). ويمكن استعمال الجنين الكامل أو أجزاء البادرات للنباتات كمُستأصَل نباتى لإكثار الأشجار مغطيات أو معراة البذور (Harry &Thorpe, 1999)، لكن يعيب هذه الطريقة تكشف عدد كبير من النباتات غير المشابهة للأم. وقد قام Kaparakis & Alderson (2002) بدراسة معدل تكشف الأشطاء أو الأجنة الجسدية من زراعة بذور الطماطم والباذنجان مباشرة فى بيئة محتوية على تركيزات عالية نسبياً تتراوح بين ١٠: ٢٠ ملجم/لتر من BA و TDZ. ولاحظا حدوث انتفاخ للجزء القاعدى من السويقة الجنينية السفلى للبادرات التى نمت فى بيئة محتوية على تركيز أعلى من ٥ ملجم/لتر وتكون كالس عقدى الشكل تكشف بعد ذلك إلى أجنة جسدية. وتشير نتائج التجربة المبينة فى جدول رقم (٦-٢) إلى أن هناك فرق بين الاستجابة لتكوين الأجنة الجسدية وتطورها بتباين تركيز ونوع الهرمون المستعمل. وقد أشارت الدراسة إلى تثبيط تكوين الأجنة الجسدية من بذور الطماطم أو الباذنجان إذا تم زراعة بذور الفلفل مع أى منهما، وحدث تطور عادى للبادرة حتى فى التركيزات العالية من السيتوكينينات. وقد يكون سبب ذلكأن بذور الفلفل تقوم بامتصاص وتكسير السيتوكينينات بسرعة مما يجعل تركيزها غير مناسب لتكوين الأجنة، أو إفرازها مادة أو مواد تثبط التنشيط الوراثى للخلايا المسئولة عن تكوين الأجنة الجنسية.

جدول ٦-٢: تأثير BA و TDZ على إنتاج الأجنة الجسدية من بذور الطماطم والباذنجان (Kaparakis & Alderson, 2002).

المعاملات (ملجم/لتر)		الباذنجان		الطماطم	
		% الاستجابة	عدد الأجنة	% الاستجابة	عدد الأجنة
BA	٠	--	--	٨٨.٩	٠.٠
	٥	--	--	٧٥.٠	٧.٢
	١٠	--	--	٧٢.٢	٦.٧
	١٥	--	--	٧٥.٠	٥.٤
	٢٠	--	--	٠.٠	١٠.٠
TDZ	٠	٣٨.٩	٣.٧	٤٢.٩	٠.٠
	٥	٥٠.٠	٥.٥	٧٧.٨	٤.٠
	١٠	٦٦.٧	٤.٨	٧٢.٢	٣.٧
	١٥	٦٠.٠	٢.٠	٦٢.٥	٤.٠
	٢٠	٧.٥	٦.٣	٧.٥	٤.٠

ثانياً: التكشف المباشر

تسمى البراعم الموجودة على أى جزء من النبات غير الساق بالبراعم العرضية، وتعتبر عملية تكوين تلك البراعم من العمليات المعقدة فى الإكثار الدقيق ويرجع ذلك إلى ضرورة حدوث العمليات التالية:

١. إحداث تغيرات فى الارتباطات الطبيعية الموجودة بين الخلايا والأنسجة.

٢. إعادة الخلايا المتكشفة إلى حالة عدم التكشف ثم دفعها للتكشف مرة أخرى. إذا لم يتكون كالس قبل تكوين العضو الجديد سميت الطريقة بالتكشف المباشر أما إذا تكون الكالس قبل العضو الجديد سميت بالطريقة غير المباشرة

٣. دفع الأنسجة لتكوين عضو جديد.

٤. نمو وتطور العضو الجديد.

يوجد فى الطبيعة العديد من النباتات التى تحمل براعم عرضية مثل *Begonia* و*Bryophyllum* ويمكن دفع هذه البراعم للنمو وتكوين نباتات بزراعة الأوراق التى تحمل هذه البراعم. والأكثر من هذا أن أوراق نبات *Agava americana* والتى لا تحمل براعم عرضية عند وجودها على النبات يمكن بتقسيمها وزراعتها فى بيئة عادية استحثاث تكوين براعم عرضية عليها تنمو وتعطى نباتات كاملة. وبالمثل فإن الأجزاء النباتية المختلفة المصدر والكبيرة الحجم نسبياً والمنزرعة معملياً يمكن أن تحفز لتكوين براعم عرضية أو أجنة جسدية أو حتى براعم زهرية على النسيج المنزرع مباشرة وبدون تكوين الكالس.

لكن لا يضمن ذلك عدم حدوث تغييرات وراثية وإن كان معدلها اقل بكثير بالمقارنة بالتكشف غير المباشر. وربما يكون من الصعب تجنب وجود أشطاء عرضية حتى فى حالة الإكثار بالعقد الساقية أو القمم النامية (Bhojwani & Razdan, 1996). ويلاحظ أن الأجزاء المنزرعة صغيرة الحجم تميل غالباً إلى تكوين الكالس ولا تتكشف مباشرة.

وعادة تكون نسبة تكشف الأجنة أقل نسبياً من تكشف الأشطاء. وأمكن تحديد الظروف المثلى لإكثار عديد من النباتات بطريقة التكشف المباشر. وتلعب نوعية وتركيز ونسبة الأوكسينات والسيتوكينينات المستعملة دوراً هاما فى الإكثار بهذه الطريقة. لكن يلعب عمر المُستأصَل النباتى دوراً حرجاً فى التكشف المباشر حيث يشير المرجع السابق إلى فقد القدرة على تكشف الأشطاء المباشر من الأوراق الفلقية لنباتات *Brassica juncea* بعد ١٠ أيام من الإنبات، وكانت أعلى ما يمكن من بادرات عمرها خمسة أيام.

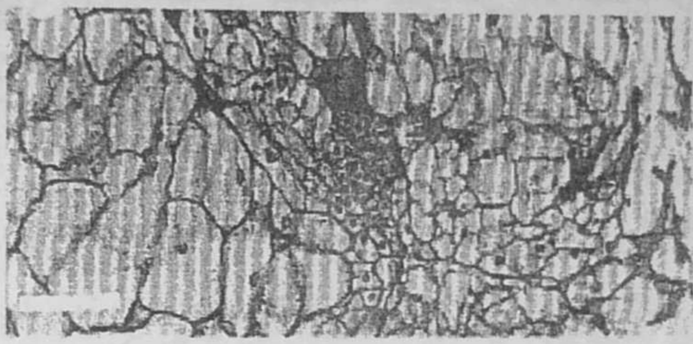
كذلك فقدت الأوراق الفلقية لبادرات *Pinus radiate* هذه القدرة بعد ثلاث أيام من الإنبات وصاحب ذلك اختفاء اللبيدات منها، لكن تحقق أعلى معدل من التكشف للأوراق الفلقية لأشجار *P. gerardiana* عندما زرعت المُستأصَلات من البذور قبل الإنبات.

من الثابت صعوبة عملية تكشف النباتات من الخلايا الفردية أو البروتوبلاست وكذلك من الكالس بالمقارنة مع تكشف الأعضاء الكاملة خاصة تلك حديثة التكوين كالأوراق الفلقية، أو السويقات الجنينية والأجنة غير كاملة التكوين. ولعل هذا هو السبب فى قلة استخدام البروتوبلاست كوسيلة لإدخال جينات جديدة للخلية النباتية. كذلك يشير (Bhojwani & Razdan, 1996) إلى استخدام التكشف المباشر للأعضاء والأجنة الجسدية كمادة للانتخاب الوراثى حيث أن النباتات المتكشفة تشتمل على بعض الاختلافات الوراثية والتى تعرف بـsomaclonal variations . وقد تتكشف الأشطاء أو الأجنة الجسدية somatic embryo من خلايا ميرستيمية حيث تنشط بعض الخلايا فى الانقسام خلال يومين من الزراعة ويزيد معدل الانقسام حتى تتكون بدايات المراكز الميرستيمية. وتسمى كتلة الخلايا الميرستيمية الكروية الشكل والتى تنتج من انقسام خلايا النسيج المنزرع بـmeristemoids وتتكون هذه المراكز بصورة عشوائية فى النسيج المنزرع كما هو موضح بالشكل رقم (٦-٨).

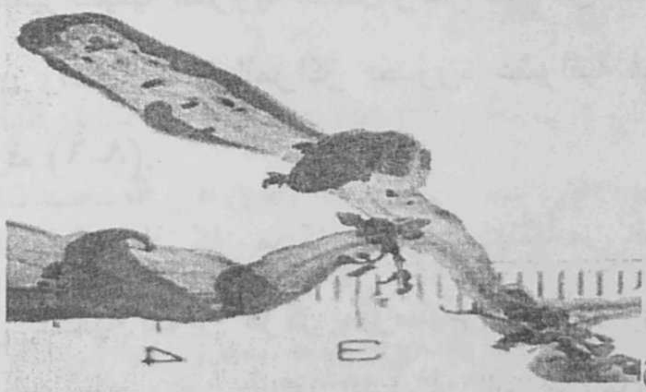
لكن لا يعرف بصورة واضحة ما إذا كان مركز الميرستيم ينشأ من خلية واحدة أو أكثر. وهناك دراسة تشير إلى إمكانية تكوين مركز ميرستيمى من خلية واحدة من خلايا البشرة وتكشف من هذا المركز ٢٢ ساق. ويمكن القول أن البرعم المتكشف ناتج من خلية واحدة لو كانت هناك طفرة من النوع solid mutant بعد معاملة النسيج بإحدى المطفرات. أما إذا كان الفرع المتكشف به كيميرا فإن التكشف يحدث من عدد من الخلايا المختلفة الناتجة من انقسام خلايا مختلفة. لكن من الجدير بالذكر أن الطفرات قد توجد أيضاً حتى فى النباتات الناتجة من خلية واحدة لحدوث طفرات أثناء الانقسام (Gahan & George, 2008).



أ



ب



ج

شكل ٦-٨: (أ) تكوين المراكز الميرستيمية والمشار إليها بأسهم بصورة عشوائية فى المُستأصَل النباتى المنزرع من أعناق أوراق نبات *Echinacea purpurea*،
(ب) صورة مكبرة (المستقيم الموضح · طوله ٥٠ ميكروميتر)، (Choffe *et al.*, 2000).
جـ التكشف المباشر للأشطاء من أوراق *Ruta gravoelens*

وقد تتكون براعم عرضية أحياناً على أوراق النباتات الموجودة داخل المزرعة عندما تنثنى الأوراق لأسفل وتلامس سطح البيئة. وهذه طريقة سهلة وجيدة لإكثار العديد من النباتات خاصة إذا كانت الأجزاء المسنة لها القدرة على تكوين براعم عرضية. كذلك فإن عدم انفصال المرحلة الأولى من زراعة الأنسجة كما قسمها Murashige (انظر الفصل الرابع) عن المرحلة الثانية يعتبر ميزة فبمجرد نقل الجزء المنزرع إلى البيئة

يحدث التكشف. ويمكن استمرار تقسيم الأجزاء الناتجة وزراعتها فى نفس البيئة للحصول على عدد أكبر من الأشطاء. ولزيادة معدل إنتاج البراعم يمكن فصل عدة مجموعات منها بعد تكوينها فى البيئة الشبه صلبة ونقلها إلى بيئة سائلة حيث تسبب الحركة المستمرة للبيئة تفتيت المراكز الميرستيمية وتكوين العديد منها. وبعد تكوين الأشطاء تنقل إلى بيئة شبه صلبة للتجذير. ويذكر Pierik (1987) أن هذه الطريقة على نطاق تجارى لإكثار بعض النباتات مثل *Saintpulia* و *Gerbera* و *Begonia* و *Cacti* و *Lilium*.

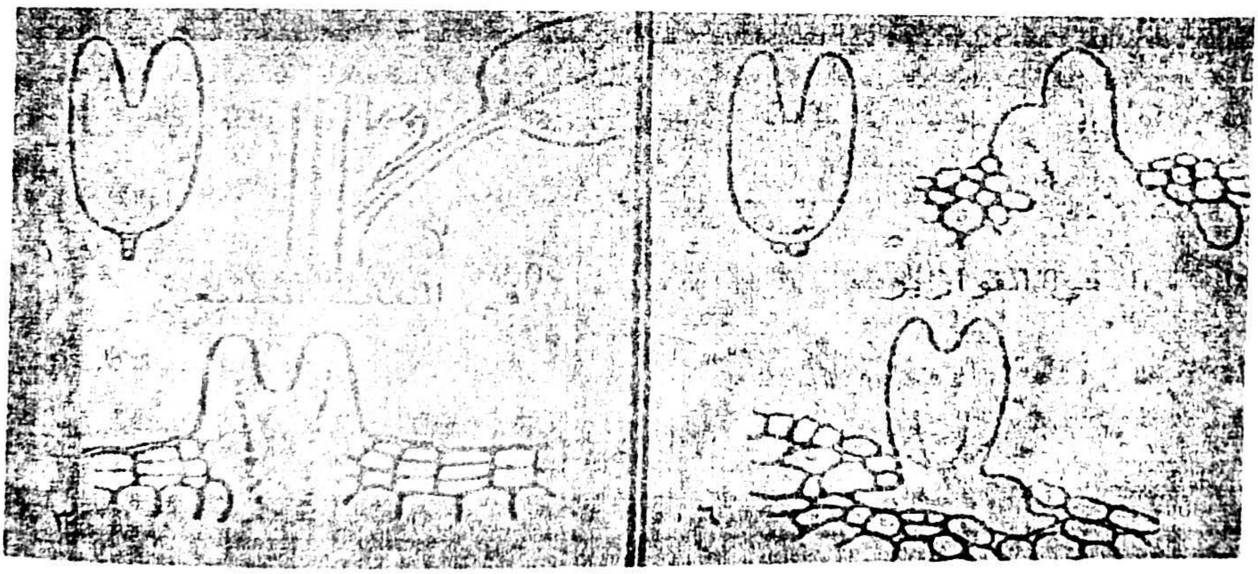
ومن الناحية النظرية يمكن بطريقة ما دفع الخلية النباتية إلى أن تستعيد قدرتها على تكوين جنين دون الحاجة لوجود الجهاز الخاص بتكوين وتطور الجنين. وعمليا ليست كل خلايا النسيج المنزرع مؤهلة من الناحية الوراثية وتم تحديدها مسبقا لتسلك هذا المسلك من التكشف. وتعمل ظروف الزراعة المعملية المثلى على دفع الجينات المسئولة عن ذلك للتعبير عن نفسها، ولا يعرف حتى الآن على وجه الدقة ما إذا كانت كل خلايا أنسجة النيوسيلة مؤهلة لتكوين أجنة جسدية أم لا، لكن تحتفظ أنسجة النيوسيلة بالقدرة على إنتاج أجنة جسدية لمدة طويلة عند زراعتها معمليا. ويمكن أن يطلق على التراكيب الميرستيمية والمعروفة بـprotocorm التى تتطور أثناء إكثار بعض أنواع الأوركيد أجنة جسدية.

ورغم الاعتقاد الكبير فى تشابه العمليات الحيوية أثناء تطور الأجنة الجسدية مع الأجنة العادية فإن بعض الأبحاث تثبت وجود تباين على المستوى الخلوى وفى المشابهات الإنزيمية وكذلك فى البروتينات التى تخلق أثناء ذلك. وحتى الثمانينيات من القرن الماضى كانت الأبحاث مهتمة بتحديد العوامل التى تشجع تكوين تراكيب تشبه الجنين الجسدى. وعند الانتقال إلى المجال التطبيقى لاستخدام الأجنة الجسدية فى الإكثار اتضح أن أغلبها غير قادر على الإنبات لعدم نضجها من الناحية الوظيفية والكيموحيوية، ومن هنا كانت الأبحاث فى العقد التالى حول إدراج مرحلة النضج للأجنة بعد

تكوينها (Von Arnold, 2008). وهناك توجه الكبير فى الاعتماد على الإكثار بالأجنة الجسدية سواء بالطريقة المباشرة أو غير المباشرة كبديل عن تكشف الأشطاء بصرف النظر عن الثبات الوراثى لأنها تقلل كثيراً من تكاليف الإنتاج لإمكانية استعمال الميكنة. وبقى القول أن لدراسة تكشف الأجنة فى مزارع القوارير أهمية كبيرة فى إلقاء الضوء على الأساس الخلوى لعملية التكشف والتطور فى النباتات الراقية (Bhojwani & Razdan, 1996) و (Von Arnold, 2008) و (Neumann *et al.*, 2009).

الفرق بين تكشف الأجنة والأشطاء

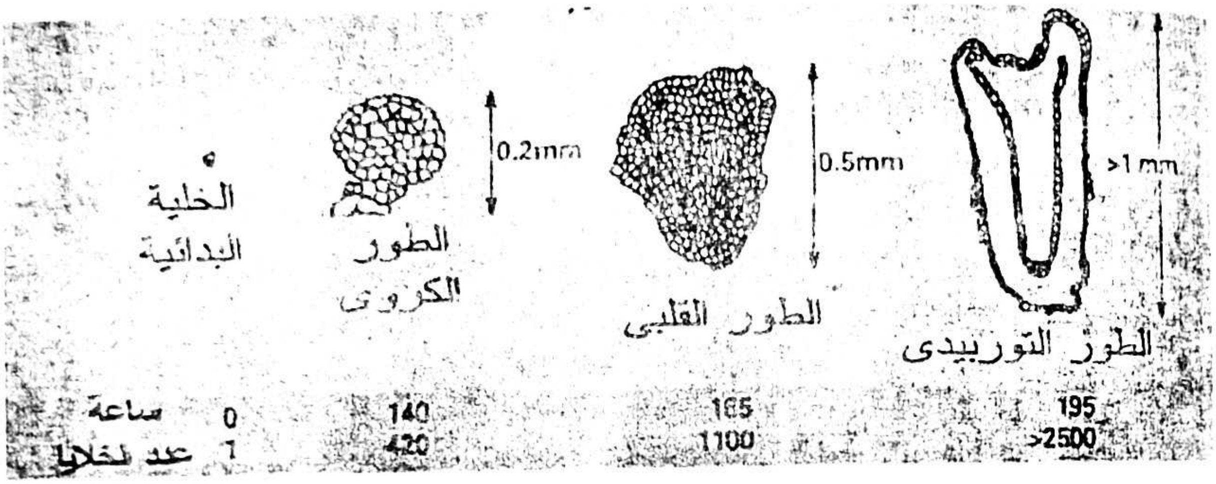
فى حالات كثيرة يكون من الضرورى تحديد طريقة التكشف للنباتات المستولدة هل هى بالتكشف المباشر أو غير المباشر (شكل رقم ٦-٩) لأهمية ذلك فى برامج التربية على سبيل المثال. ويمكن التفريق بين النباتات الناتجة من تكشف الأشطاء عرضياً وتكشف الأجنة الجسدية على أساسين:



شكل ٦-٩: رسم تخطيطى يبين الفرق التشريحى بين النهاية القاعدية للجنين (١، ٤، ٦) وللأشطاء (٢،٣،٥) فى القوارير وفى النبات الطبيعى. الخطوط المتقطعة تشير إلى الأوعية الناقلة فى العضو (Bhojwani & Razdan, 1996).

١. يبدأ تكشف الأجنة سواء الجسدية أو الجنسية من خلية واحدة ويبين شكل رقم (٦-١٠) مراحل تكوين الأجنة الجسدية فى نباتات الجزر. ومن ثم يلاحظ وجود

القطبية فى الجنين المتكون أى وجود قمة ميرستيمية للأشطاء وأخرى للجذور. ويكون هناك اتصال مغلق للأوعية الناقلة بين المجموع الخضرى والجذرى. أما الأشطاء المتكشفة عرضياً فلا تحتوى على قمة ميرستيمية للجذور لكن من الممكن ان تتكون الجذور عرضيا فى مرحلة لاحقة لتكشف الأشطاء كما فى الشكل (٦-١١).

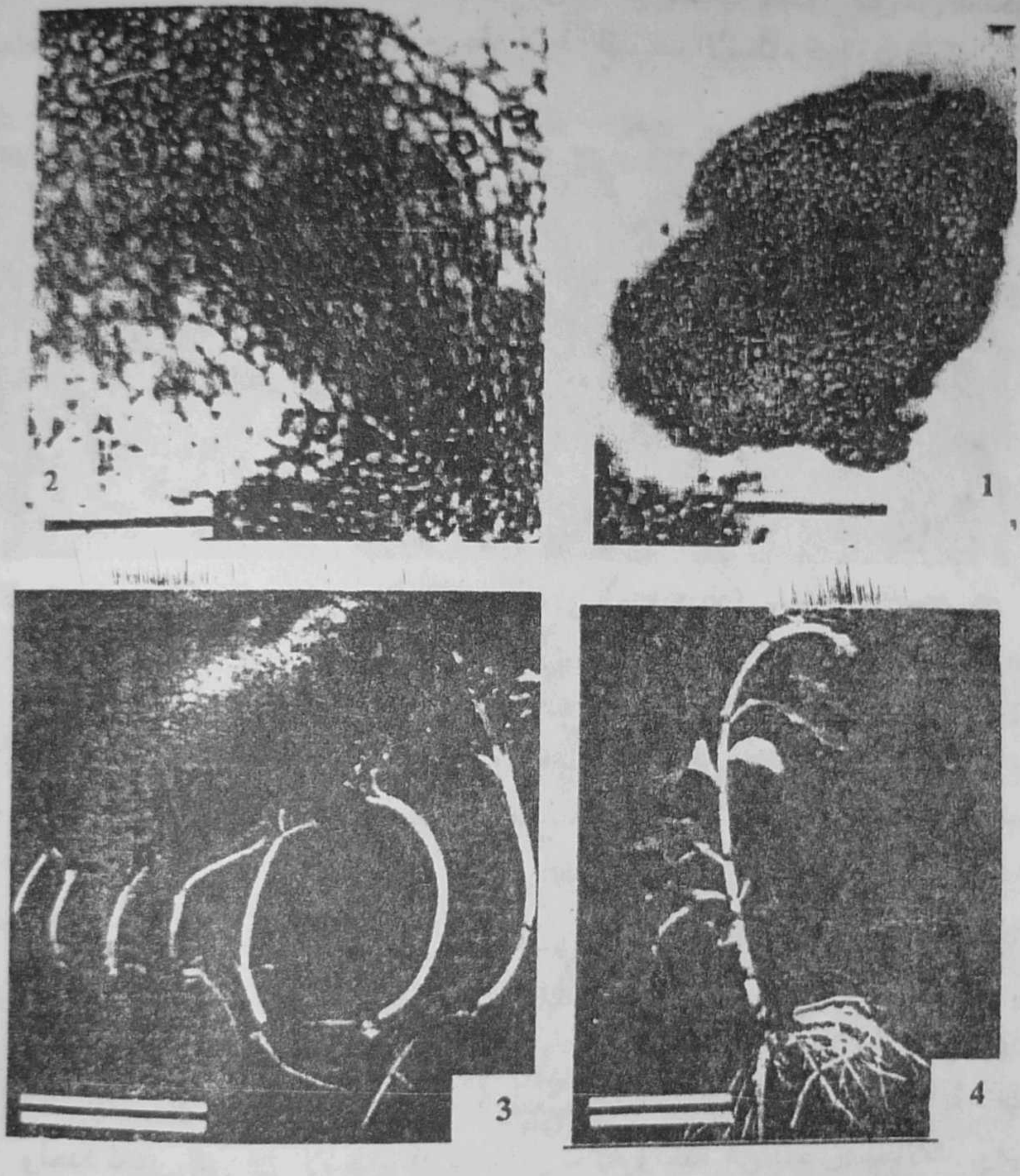


شكل ٦-١٠: مراحل تطور تكوين الأجنة الجسدية فى الجزر (Stafford & Warren, 1991)

٢. لابد من وجود البروتينات المميزة للأجنة فى الأوراق الفلقية للأجنة الجسدية المتكشفة على العكس من أوراق الأشطاء المتكشفةعرضيا. وتوضح دراسة Maria de los *et al.* (1997) على تكشف الأجنة الجسدية من نباتات قصب السكر هذا التغيير فى البرويتن حتى فى مرحلة تكوين الكالس.

٣. وعلى الرغم من الاعتقاد بأن الأجنة الجسدية تنشأ من خلية واحدة والأشطاء تتكشف من عدد من الخلايا فإن بعض المشاهد تمثل عدم إنتاج أشطاء تتضح بها ظاهرة الكيميرا عقب تعريض النبات الأم للإشعاع مثلا، وكذلك إنتاج نباتات محورة وراثياً بنقل الجينات إليها بالوسائل المختلفة حيث ينقل الجين إلى خلية واحدة تشير إلى أن الأشطاء قد تنشأ من خلية واحدة فى بعض الحالات. وفى الوقت الذى يعتبر فيه تكوين الأجنة الجسدية غير المباشرة ذو أهمية كبرى فى الإكثار الخضرى فإن تكوين الأجنة المباشر غير فعال فى الإكثار وذلك لانخفاض معدل تكوينها وتكوين أجنة ثانوية تلتصق بها وتشوهها أو تعيق إنباتها. ولسهولة إنتاج الأجنة الجسدية بالمعلق الخلوى فإنها تقلل من استعمال الأيدى العاملة فى

عمليات الزراعة المختلفة ويمكن من استخدام الطرق الآلية فى الإكثار الخضرى، مما يقلل من التكاليف.



شكل ٦-١١: قطاع فى كالس نبات *Cephaelis ipecacuanha* يوضح التكشف غير المباشر للجنين الجسدى (١، ٢) يلاحظ وجود بداية تكوين قمة الجذر rp والأوعية الناقلة pvs فى المجموع الخضرى ويلاحظ الاتصال بينهما، (٣) مراحل مختلفة من إنبات الأجنة،(٤) نبات كامل بعد الأقلمة. (المستقيم الموضح يمثل طول ١٠٠، ١٠٠ ميكروميتر، ٢٠، ٢٠مم على التوالي)(Rout *et al.*, 2000).

ثالثاً: التكشف غير المباشر فى مزارع الكالس

لقد حظى تكوين الكالس ومن ثم المعلق الخلوى بدراسة العديد من العلماء وقد صنف Collin & Edwards (1998) كتاباً فى مزارع الكالس والمعلق الخلوى والتطبيقات العملية لهذا فى الإكثار الدقيق عبر تكوين الأجنة الجسدية بالإضافة إلى إنتاج المواد الثانوية فى المفاعلات الحيوية. وفى هذا الجزء ستقتصر الإشارة إلى بعض الأساسيات الخاصة بمزارع الكالس والمعلق الخلوى. ويمكن الرجوع إلى المصدر المشار إليه وكذلك George (1993) للمزيد من التفصيل حول ما سيرد فى هذا الجزء. يستهل تكوين الكالس بارتداد الخلايا المتكشفة للمُستأصل النباتى إلى حالة عدم التكشف وهذا الارتداد غاية فى الأهمية حيث أنه يعطى الخلايا البالغة المتكشفة فرصة للتعبير عن تركيبها الوراثى الخاص بإعادة التكشف. وللخلايا التى ما زالت فى طور الانقسام المقدرة على الارتداد إلى الحالة الميرستيمية وتكوين الكالس بدرجة أعلى من تلك المتكشفة. وتتحكم منظمات النمو الداخلية والخارجية المضافة إلى وسط النمو بدرجة عالية فى هذا الارتداد والانقسام، وبتأثير تلك العوامل خاصة منظمات النمو قد تستمر الخلايا فى مرحلة تكوين الكالس وعدم التكشف أو تدخل مرحلة التكشف (Neumann *et al.*, 2009). ويترتب على ذلك الانقسام تكوين كتلة غير متميزة من الخلايا يطلق عليها الكالس.

وتستجيب أغلب الأجزاء النباتية للنباتات ذات الفلقتين فى القوارير للظروف المشجعة لتكوين الكالس على العكس من ذوات الفلقة الواحدة حيث يقتصر تكوين الكالس على الأجنة، والأوراق حديثة التكوين، والعقد الساقية، وكذلك النورات الزهرية. وكانت بداية تكوين الكالس فى مزارع الأنسجة فى عام ١٩٣٩ عندما لاحظ Gautheret تحول

الأجزاء التى تم زراعتها من أنسجة جذور الجزر فى وسط غذائى يحتوى على أملاح معدنية وجلوكوز وبعض الفيتامينات و IAA إلى كتلة غير متكشفة من الخلايا. ولم تكن لهذه الخلايا آنذاك فائدة تطبيقية فى الإكثار الدقيق للنباتات،إلا أنه بتقدم زراعة الأنسجة استطاع كثير من الباحثين إنتاج أشطاء من كالس العديد من النباتات باستخدام أجزاء نباتية مختلفة متضمنة أنسجة الكامبيوم، اللحاء، القشرة، النخاع بل ومن أنسجة الخشب أحياناً. وتقسم مراحل نمو الكالس إلى ثلاث مراحل على أساس عدد الخلايا فى العشيرة وأيضها وبلوغ الكالس شكله النهائى، وهذه المراحل هى:

١. **مرحلة الاستحثاث Induction:** وهى عملية إعداد الخلية للانقسام وتتميز بنشاط أيضى عالى وتخليق بعض الجزيئيات الدقيقة الضرورية للانقسام.
٢. **مرحلة الانقسام Division:** وفيها تتحول الخلية غير الميرستيمية إلى خلية ميرستيمية ذات معدل انقسام عالى ويقل فيها متوسط حجم الخلايا.
٣. **مرحلة التكشف Differentiation:** حيث تحدث زيادة فى حجم الخلايا ويزيد حجم الفجوات العصارية ويقل معدل المواد المسئولة عن الانقسام ويحدث اتزان بين عمليتى الانقسام والاستطالة. ويعترض البعض على استعمال مصطلح differentiation فى هذه المرحلة حيث أن التغير الحادث يكون مجرد تغيير سيتوبلازمى فقط دون تغيير واضح فى الشكل الظاهرى -كما يعنى المصطلح- لكن بالطبع تقود هذه التغيرات السيتوبلازمية فى النهاية إلى تكشف الخلايا وتميزها كأن تتحول بعض خلايا الكالسعلى سبيل المثال إلى خلايا خشب. ويعتبر تكشف بعض الخلايا إلى خلايا خشب خطوة أولى فى تكشف الكالس إلى أشطاء أو جذور.

وقد بينت دراسة Thorpe & Murashige (1970) على تكشف كالس نباتات الدخان وجود تباين على مستوى الأحماض الأمينية والبروتينات والكربوهيدرات فى الكالس غير المتكشف وذلك المتكشف. ورغم أن خلايا نوعى الكالس كان ذات محتوى

متماثل من DNA فإن خلايا الكالس المتكشفة احتوت على تركيز أعلى من RNA والبروتين. وكذلك سجل اختلاف كبير في محتوى الخلايا من النشا، ومن المعروف أن لتجميع النشا في الخلايا دوراً واضحاً في تكشف الأشطاء حيث لاحظ ما يلي: أ) حدوث تجميع كثيف للكربوهيدرات في الخلايا التي تتحول إلى خلايا متكشفة دون غيرها. ب) لا تتكون المراكز الميرستيمية في المناطق التي تعاني من نقص تراكم النشا. ج) يسبق ترسيب النشا في الخلايا مظاهر عملية التكشف ويصل أعلى تركيز بعد ١١ يوم من استهلال الزراعة بدء تكوين المناطق الميرستيمية بعد ذلك بثلاثة أيام. د) إذا تم معاملة الكالس بحامض GA_3 فإن تكوين المناطق الميرستيمية يُثبط لمنع الحامض السابق عملية تخليق النشا وبالتالي لا يصل تركيزه إلى الحد الضروري للتكشف. وربما يعمل النشا والسكر المضاف للبيئة كمصدر الطاقة الضرورية لعملية التكشف. ويلخص (Bhojwani & Razdan, 1996) نتائج تجارب أخرى مشابهة تبين سرعة عملية التنفس مع زيادة تركيز العديد من الإنزيمات مثل phosphatase و ATPase و succinate dehydrogenase مع زيادة تخليق البروتين وانخفاض محتوى اللبيدات والسكريات الذائبة.

يتم الحصول على الكالس بتعقيم النسيج النباتي ثم نقله إلى البيئة المغذية الشبه صلبة عادة، وغالباً تُحفظ المزرعة في الظلام. ويمكن بعد ذلك نقله واستمرار نموه في بيئة سائلة. وتختلف قدرة النباتات على تكوين الكالس اعتماداً على العوامل المؤثرة على النمو والتكشف في زراعة الأنسجة، لكن عموماً قدرة النباتات على تكوين كالس أعلى من قدرتها على التكشف. ورغم أن البيئة التي استعملت في البداية لتكوين الكالس كانت بسيطة التركيب إلا أن البيئات المستعملة الآن معقدة ولابد أن يضاف إليها بعض منظمات النمو وخاصة أحد الأوكسينات (IAA, NAA, 2,4-D)، ويختلف التركيز من ٠.٠١-١٠ ملجم/لتر من نوع نباتي إلى آخر. وتختلف المدة اللازمة لتكوين الكالس من عدة أيام إلى عدة أسابيع. وبفحص التغير في الشكل العام لكالس الدخان وجد أن معظم النمو يحدث في

المنطقة الملاصقة للبيئة. وباستمرار النمو يحدث اختلاف فى معدل نمو وتضاعف الخلايا فى الأجزاء المختلفة من الكالس. ومن المعروف أن زيادة عدد وحجم الخلايا البكتيرية والفطرية تتم عقب الطور التضاعفى مباشرة ويتوقف معدل النمو الخارجى للمستعمرة على مقدار الإمداد بالمواد الضرورية للنمو. وبهذا يكون معدل النمو فى المحيط الخارجى للمستعمرة خطياً، أما فى الكالس فإن معدل النمو قد لا يكون خطياً لأن النمو والانقسام يحدثان نتيجة لتأثير الجرح كما سبق ذكره.

فى الغالب تكون خلايا الكالس غير متماثلة بوجود أكثر من نوع من الخلايا فى نفس الكالس قد تكون احدها ذات قدرة على التكشف دون الأخرى. وهذا التباين يمكن أن يكون فى اللون، الشكل الظاهرى، التركيب، النمو، أو عمليات الأيض، فحتى الكالس الذى يبدو أنه متماثل تماماً فى المظهر الخارجى قد يحتوى على بعض الخلايا ذات النشاط الأيضى المختلف. وربما يرجع هذا التباين إلى اختلاف التركيب الوراثى حتى داخل نفس النوع أو اختلاف الأنسجة التى كونت الكالس، أو لتأثير الظروف البيئة ومكونات البيئة. ويمكن للخلايا ذات القدرة علي التكشف الاحتفاظ بهذه القدرة فترة طويلة ويقف نشاط الخلية كأن تحفظ فى النتروجين السائل بطريقة خاصة، لكن باستمرار الزراعة فى القوارير قد تتراكم بعض التغييرات الوراثية التى من شأنها أن تفقد الخلية القدرة على التكشف (George, 1993). ويلاحظ فى حالة استعمال عضو نباتى مثل الجذر لتكوين الكالس أن خلايا الكالس المتكونة من الخلايا المختلفة فى الجذر ليست لها نفس القدرة على النمو وربما يطغى أحد هذه الأنواع على الطرز الأخرى وتكون هى السائدة فى الكالس. ويتبين من ذلك أن الكالسين المتكونين من نفس النسيج والنامبين فى بيئتين مختلفتين لا بد وأن ينظر لهما على أنهما سلالتين مختلفتين. ويجب العمل على إيجاد الظروف المثلى للحد من درجة التباين التى توجد بين خلايا الكالسات المختلفة والخلايا فى نفس الكالس. وإذا كان برنامج الإكثار الدقيق معتمداً على الكالس، فإن

الكالس لابد أن يفى بشرطين أساسيين هما الاحتفاظ بالقدرة على التكشف باستمرار التقسيم والنقل إلى بيئة جديدة والثبات الوراثى.

يتوقف الشكل الظاهرى للكالس على أسلوب نموه فباستمرار نمو الكالس يتم دفع الخلايا إلى أعلى والخارج بعيداً عن سطح البيئة. وعلى ذلك يحدث تدريج فى تركيز المواد الغذائية ومكونات البيئة والغازات فى الخلايا بالقطاعات المختلفة من الكالس. ويحدث أيضاً تدريج فى تراكم نواتج عمليات البناء فالخلايا الملاصقة للبيئة تفقد تلك المواد أسرع من الخلايا البعيدة عن سطح البيئة. ويؤثر حتماً التدريج فى توزيع المركبات المختلفة بطريقة إيجابية أو سلبية على أسلوب نمو وتكشف الكالس. ويمكن تقليل التباين الحادث فى الكالس والحصول على درجة عالية من التماثل بإتباع نظام محدد ودقيق لتقسيم وإعادة زراعة الكالس على فترات قصيرة بحيث تتم زراعة الأجزاء المتماثلة ظاهرياً.ومعدل نمو الخلايا فى المعلق الخلوى يكون سريع جداً بالمقارنة مع خلايا الكالس فى البيئة شبه الصلبة كما تكون درجة التشابه بين الخلايا فى المعلق الخلوى عالية. وتلك من المميزات التى تجعل المعلق الخلوى يستخدم فى بعض الأغراض التى لا يفضل فيها استخدام الكالس.

فى معظم الحالات يتم الحصول على الكالس بوضع الجزء النباتى فى بيئة شبه صلبة محتوية على تركيز عالى من الأوكسين وتركيز منخفض من السيتوكينينات. وقد يتم تقسيم ونقل الكالس المتكون مرة أو أكثر إلى بيئة جديدة بنفس التركيب بغرض استمرا النمو. أو ينقل الكالس إلى بيئة أخرى مختلفة فى محتواها من منظمات النمو فيضاف تركيز أعلى من السيتوكينينات وأقل من الأوكسين لإحداث التكشف. ولما كان الكالس الناتج من نفس الجزء المنزرع غير متجانس فى صفاته ومنها قدرته على التكشف غالباً، فإنه يجب العمل عند تقسيم ونقل الكالس استعمال الأجزاء التى يعتقد أنها مناسبة دون غيرها. وذلك لأنها قد تعيق وتنافس الأجزاء ذات القدرة على التكشف. وقد

اتضحت هذه الظاهرة فى إكثار نباتات *Pelargonium* وغيرها من النباتات (Holdgate, 1977). لكن يتطلب انتخاب الكالس المتسم بالقدرة على التكشف خبرة عالية، وعموما الكالس ذو المظهر المائى المفكك friable أقل قدرة على التكشف من الكالس المتماسك compact أو المتكون عليه عقد organsed callus. ويعيب استعمال الكالس كطريقة للإكثار زيادة معدل حدوث تغير وراثى، لكن إذا أمكن التحكم فى هذا المعدل فمن الممكن الاعتماد على الكالس فى الإكثار الخضرى.

لوحظ زيادة فى سرعة نمو الكالس إذا نقل بعد تفتيته إلى أجزاء صغيرة إلى بيئة سائلة. وتم استخدام هذه الطريقة للإسراع فى الإكثار الخضرى لعدد من النباتات. فعلى سبيل المثال، إكثار نبات *Hemerocallis* بطريقة التكشف غير المباشر يتطلب ١٣٥ يوم من بدء الزراعة حتى نقل النباتات إلى الحقل. وتعتبر الفترة اللازمة لتكوين الكالس ذو القدرة العالية على التكشف هى الأطول فى هذا البرنامج، وأمكن تقليل المدة اللازمة للإكثار بنقل الكالس المتكون فى البيئة شبه الصلبة إلى بيئة سائلة للإسراع فى إكثاره. وبعد زيادة العدد يتم نقل كتل الكالس المتكونة إلى البيئة شبه الصلبة مرة أخرى لدفعه للتكشف. لكن التركيز المطلوب من منظمات النمو لدفع الكالس إلى تكوين المعلق الخلوى أى تفكك الخلايا يكون عالى بالقدر الذى يثبط التكشف بعد ذلك. والمشكلة الأخرى أن التغيرات الوراثية تزيد بطول المدة من الزراعة حتى التكشف (Pierik, 1987).

التكشف غير المباشر للأشطاء

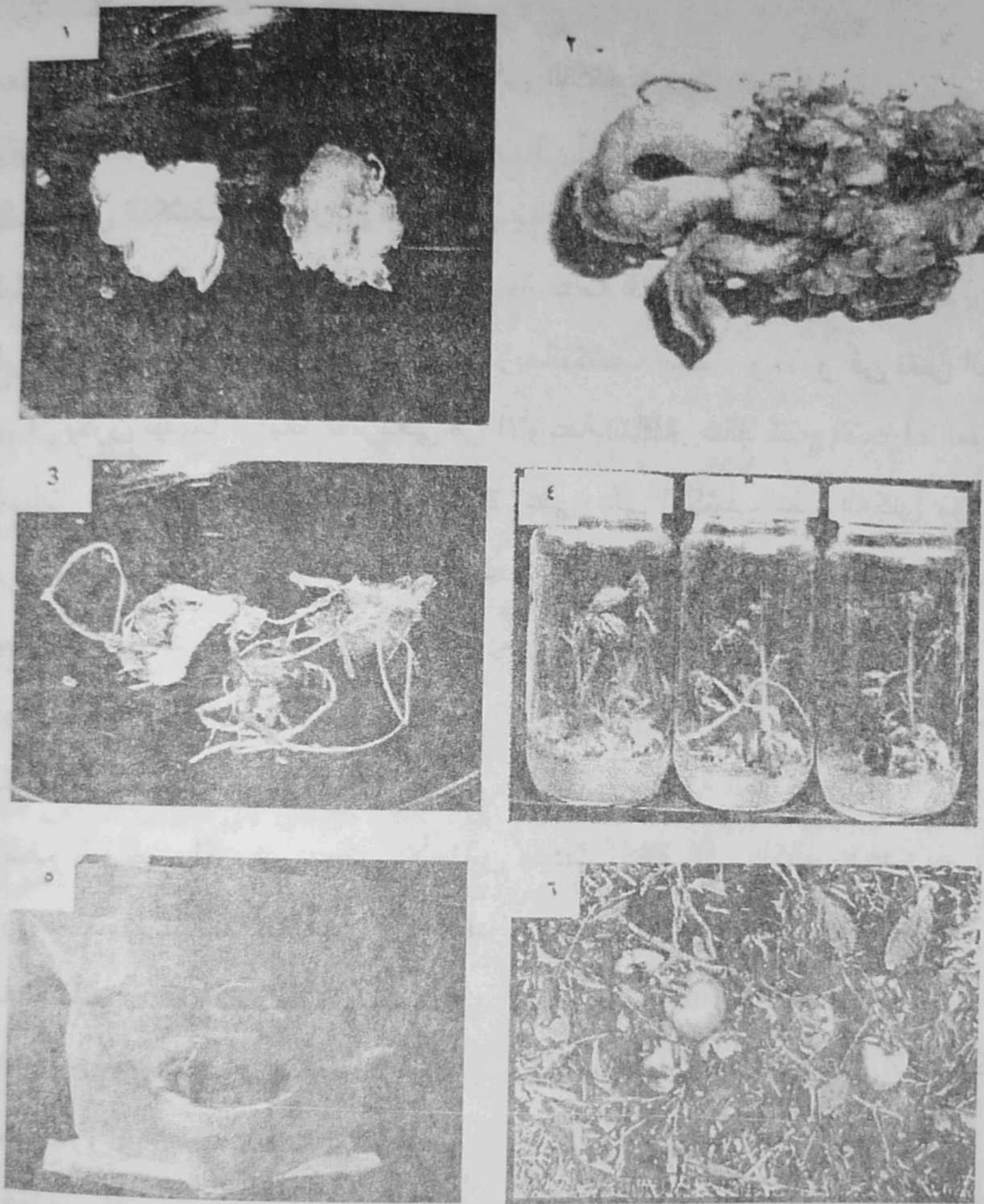
بعد اكتشاف السيتوكينينات أوضح كلا من Miller فى سنة ١٩٥٥ و Skoog فى سنة ١٩٥٧ أن الكالس المتكون من أنسجة نبات الدخان قد يستمر على حالته دون تكشف أو يتكشف منه جذور أو أشطاء عند إضافة نسب محددة من السيتوكينينات والأوكسينات إلى بيئة النمو، حيث تشجع هذه الظروف تحويل الخلية إلى الحالة الميرستيمية واستعادة قدرتها على التكشف. فإذا كانت نسبة السيتوكينينات إلى

الأوكسينات مرتفعة فإن ذلك يدفع الكالس إلى تكشف أشطاء والعكس يشجع تكشف الجذور، أما التركيز المتوسط من الأوكسينات والسيتوكينينات يشجع استمرار نمو الكالس على حالته.

ويعد عمر الكالس عاملاً هاماً فى التكشف حيث تفقد كالسات معظم الأنواع النباتية قدرتها على التكشف بعد فترة من زراعتها مع وجود تباين وراثى فى قدرة الكالس على التكشف. وتجدر الإشارة إلى أنه إذا كانت البيئة مشجعة لتكوين جذور فهى غالباً غير مناسبة لتكشف الأشطاء، وبصفة عامة فإن قدرة الكالس على تكوين جذور أعلى من قدرته على تكوين أشطاء. لكن ربماتتكشف أشطاء وجذور فى نفس البيئة لكن دون أن يكون بينهما ارتباط تشريحى فى الأوعية الناقلة. غالباً تنتج الأجزاء الميرستيمية للبادرات حديثة الإنبات كالسات لها قدرة أعلى على التكشف على العكس من الأجزاء غير الميرستيمية للأعضاء المسنة. وتحت نفس الظروف قد يحدث تكشف للأجنة الجسدية والتى قد يظن أنها أشطاء لكن يميز النبيتات الناتجة من إنبات الأجنة الجسدية وجود الأوراق الفلقية والبروتين المميزة للأجنة. وعادة ما يكون إنتاج الأشطاء من الكالس بطئ نسبياً فى معظم النباتات، وغالباً تكون البيئة المشجعة لنمو الكالس مثبطة للتكشف المباشر. لكن فى بعض الأجناس يحدث تكشف فى الكالس تحت نفس ظروف الزراعة. تعطى النباتات ثنائية الفلقة كالس ذو قدرة تكشفيه عالية وذلك من أجزاء نباتية متباينة كأجزاء الورقة، السوق، الجذور، الأجزاء المخزنة، قمم الأفرع، أنسجة البادرات (George, 1993). ويوضح شكل رقم (٦-١٢) مراحل الحصول على نباتات كاملة من كالس الأوراق الفلقية لنبات الطماطم.

أما فى النباتات أحادية الفلقة فإن الأنسجة التى يمكن أن تعطى كالس ذو قدرة تكشفية تكون محدودة وغالباً تتركز فى الأجنة، والأوراق حديثة التكوين، والعقد الساقية والأجزاء الزهرية غير الناضجة. أما فى الأشجار فإن الأنسجة ذات القدرة التكشفية هى

القريبة من الحزم الوعائية بالسوق والجذور. ومن الضرورى أن تستخدم أنسجة ذات خلايا قادرة على الانقسام لإرتباط ذلك بالقدرة على التكشف.



شكل ٦-١٢: مراحل زراعة الأنسجة لنباتات الطماطم.(١) الأوراق الفلقية فى بداية تكوين الكالس، (٢) تكشف الأشطاء اعتماداً على منظمات النمو الموجودة بالبيئة، (٣) تكشف الجذور اعتماداً على منظمات النمو الموجودة بالبيئة، (٤) نقل الأشطاء المتكشفة إلى بيئة التجذير، (٥) أقلمة النباتات تحت الأغطية البلاستيكية، (٦) النباتات المنقولة للحقل بعد الأقلمة.

الكالس المتعضون

سبق القول أن تكشف البراعم يتم من مراكز ميرستيمية تتكون عشوائياً بالكالس وبذلك تكون عرضة لحدوث تغيرات وراثية متباينة. لكن لوحظ أحياناً تكوين نوع من الكالس يطلق عليه organized callus أو semi-organized callus وتزيد احتمالية الحصول على هذا النوع من الكالس عند استخدام أنسجة ميرستيمية. وهذا الكالس عبارة عن كالس متكون من مجموعة من الخلايا الميرستيمية السطحية التى توجد فوق مركز من الخلايا ذات الفجوات العصارية الكبيرة والتى تعمل كوسيلة لتدعيم وتغذية الخلايا الميرستيمية.

وتعمل ميرستيمات الطبقة الخارجية على تثبيط انقسام الخلايا الموجودة بالمركز. ومن أمثلة هذا النوع، الكالس الناتج من زراعة القمم الميرستيمية لنباتات Rhdondrohn فيبدو الكالس كحبيبات ميرستيمية صغيرة خضراء اللون تتكشف بدورها إلى أفرع. كذلك الكالس المتكون فى قواعد الأفرع فى بعض مزارع الأشطاء. ويضمن هذا النوع من الكالس عدم حدوث تغير وراثى بمعدل مرتفع فى النبيتات الناتجة. لكن تتوقف إمكانية الحصول على هذا النوع من الكالس على الطريقة المتبعة فى الزراعة فيجب ألا تعمل منظمات النمو على سرعة انقسام الخلايا الموجودة بالمركز. وفقد الكالس المتعضون لنبات *Anthurium* هذه الصفة عند تقسيمه ونقله عدة مرات إلى بيئة جديدة. لكن باستبعاد الكالس غير المتعضون من الزراعة أمكن المحافظة على هذا التركيب مدة أطول وتكشفت أعداد أكبر من النباتات Geier (1986). وقد استخدم الكالس المتعضون فى إكثار نباتات القرنفل وذلك بتقسيم القمم النامية قبل زراعتها.

التكشف غير المباشر للأجنة الجسدية

قد تتكون الأجنة الجسدية بطريقة غير مباشرة أى بعد تكوين الكالس حيث تنقسم بعض خلايا النسيج المؤهلة وراثياً وتكون الجنين الجسدى. وتتكون الأجنة الجسدية داخلياً

أو خارجياً على نسيج الكالس، لكن يلاحظ فى معظم الحالات أنها تتكون من كالس يشبه البراعم وهو ما يعرف بـ bud-like mass tissue وعلى العكس من تكشف الأفرع يتكشف الجنين من خلية واحدة ولهذا أهمية كبيرة فى الإكثار الخضرى لضمان عدم وجود كيميرا فى النبيتات الناتجة. وغالباً ينتج الكالس الذى له قدرة جزئية أو كلية على تكوين الأجنة الجسدية بطريقة غير مباشرة أثناء زراعة أنسجة ميرستيمية مثل الجنين الجنسى، النيوسيلة، البادرات حديثة الإنبات، ومبادئ الأوراق والبراعم الزهرية. ويمكن القول أن الأجزاء القادرة على إنتاج الأجنة الجسدية بطريقة مباشرة قادرة أيضاً على إنتاج الأجنة الجسدية بطريقة غير مباشرة. لكن تقل تلك القدرة فى معظم الحالات باستمرار تقسيم وإعادة زراعة الكالس. يلاحظ من الناحية التشريحية أن مجموعة الخلايا التى تنقسم لتكون الجنين تكون منفصلة عن الخلايا المجاورة ويسهل إزالتها من الكالس فى البيئة السائلة حيث تطفو على سطح البيئة. وتتميز هذه الخلايا بصغر حجمها وكبر حجم النواة وعدم وجود فجوات عصارية وكثافة السيتوبلازم كما يبين الشكل رقم (٦-١٣). تختلف سرعة ومعدل تكشف الأجنة الجسدية من الكالس باختلاف الأنواع النباتية فقد تتكون بسرعة وبمعدل عالى وربما تحتاج لمدة طويلة من بداية تكوين الكالس حتى تكوينها. وبصورة عامة يصعب الحصول على الأجنة الجسدية من كالس أو المعلق الخلوى للعديد من النباتات ويبين George & Debregh (2008) أن ذلك يتطلب من الناحية العملية ملاحظة ما يلى:

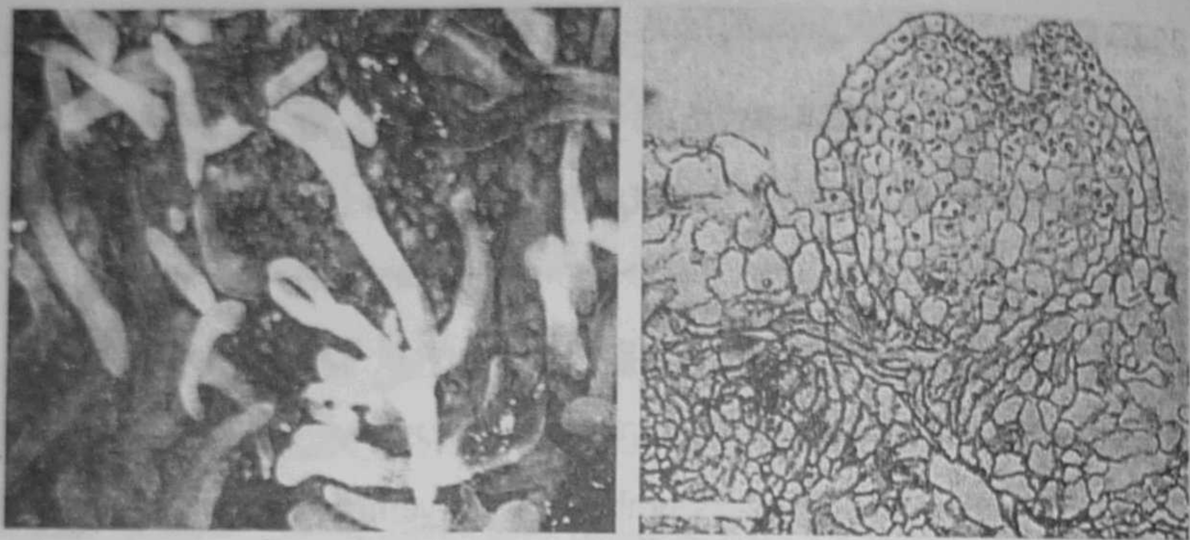
١. التباين الواسع بين الأنواع أو حتى بين الأصناف التابعة لنفس النوع.

٢. كما هو الحال فى تكشف الأجنة الجسدية بطريقة مباشرة فإنه فى مرحلة تأسيس المزرعة يضاف إلى البيئة الأوكسينات التى يجب أن تزال كلياً أو يخفض تركيزها إلى الحد الأدنى فى المراحل التالية لأن الأوكسينات قد تقلل أو تمنع تكشف الأجنة الجسدية.

٣. يجب أن يهتم بشدة بتركيز السكر فى البيئة فقد لا تتكون الأجنة الجسدية إذا كان تركيزه عالياً. كذلك يفضل إضافة النيتروجين فى صورة مختزلة كالأمونيا أو فى

صورة أحماض أمينية مثل الألانين أو الجلوتامين (Salajova *et al*., 1999) و (Wilson *et al*., 1996)

٤. يعتبر بقاء المزرعة فى مرحلة استحثاث تكوين الأجنة من المراحل الحرجة فطول هذه الفترة قبل إعادة التقسيم والزراعة قد يفقد الخلايا القدرة على تكوين الأجنة.



شكل ٦-١٣: على اليمين الطور القلبى للأجنة الجسدية المتكشفة من كالس نبات *Echinacea purpurea* بعد ٢١ يوم من الزراعة (المستقيم يمثل ٣٢٠ ميكروميتر) (Choffe *et al*., 2000). وعلى اليسار تكشف الأجنة الجسدية فى معلق الخلايا حيث يلاحظ وجود الأوراق الفلقية والقمم الميرستيمية للجذور.

لوحظ فى بعض الحالات تكوين أجسام تعرف بالأبصال الكاذبة pseudobulbils تشبه الأبصال فى شكلها المورفولوجى على الكالس ذو القدرة العالية على تكوين الأجنة الجسدية. هذه الأجسام عبارة عن أجنة جسدية فى مرحلة النمو globular وتحت الظروف غير المحفزة لاستكمال تطورها إلى أجنة كاملة فإنها تزيد فى الحجم وتفقد قدرتها على التطور. ويمكن استخدام هذه الطريقة فى الإكثار المعملى للنباتات من المعلق الخلوى لضمان الحصول على عدد كبير نسبياً من النباتات، لكن التركيزات المرتفعة من الأوكسين اللازمة لتكوين المعلق الخلوى مثبطة لتكشف الأجنة الجسدية. هذا بالإضافة إلى إنتاج أجنة مشوهة ذات عدد أكبر من الأوراق الفلقية أو بها

التحام مما يعيق إنباتها. ومع هذا فإن هذه الطريقة هى الأنسب من بين طرق الإكثار المعملى الأخرى لبعض النباتات وكثير من الأشجار الخشبية على وجه التحديد مثل نخيل الزيت والبن العربى (Bajaj, 1992). لكن يعيق استعمال هذه الطريقة لإكثار عديد من النباتات بالإضافة إلى صعوبتها عدة أسباب منها:

١. هناك احتمالية عالية لحدوث طفرات.
٢. فقد القدرة على تكوين الأجنة باستمرار تقسيم ونقل الكالس.
٣. فى بعض الحالات تتكون الأجنة لكنها تدخل فى دور سكون عميق ويكون من الصعب كسره فى بعض النباتات.

ويجب الإشارة إلى أنه ببدء تكوين الأجنة الجسدية قد تتوالى عملية تكوين الأجنة الجسدية الثانوية فيما يعرف بـ repetitive embryogenesis. ويطلق علي الأجنة التى تتكون تباعاً polyembryony أو secondary embryo وذلك حيث تتغيب العوامل التى تمنع تكوين أجنة ثانوية عند تكوين الجنين الجنسي. ويمكن أن تتكون الأجنة الثانوية على محور الجنين الأصلى، وربما من خلايا محددة كالبشرة (McGranahan *et al.*, 1988). وفى الغالب تكون النباتات الناتجة من تكشف الأجنة الجسدية بطريقة غير مباشرة عادية من الناحية الظاهرية وكذلك التركيب الخلوى، لكن قد تتكون أجنة مشوهة كما سبق القول. ويكثر حدوث ذلك عندما تتكشف الأجنة من كالس أو معلق خلوى تم تنميته لمدة طويلة، فنباتات القمح الخالية منالكلوروفيل والناتجة من الأجنة الجسدية بطريقة غير مباشرة زاد عددها طرديا مع زيادة عمر المزرعة (George & Debergh, 2008).

رابعاً: التكشف غير المباشر فى المعلق الخلوى

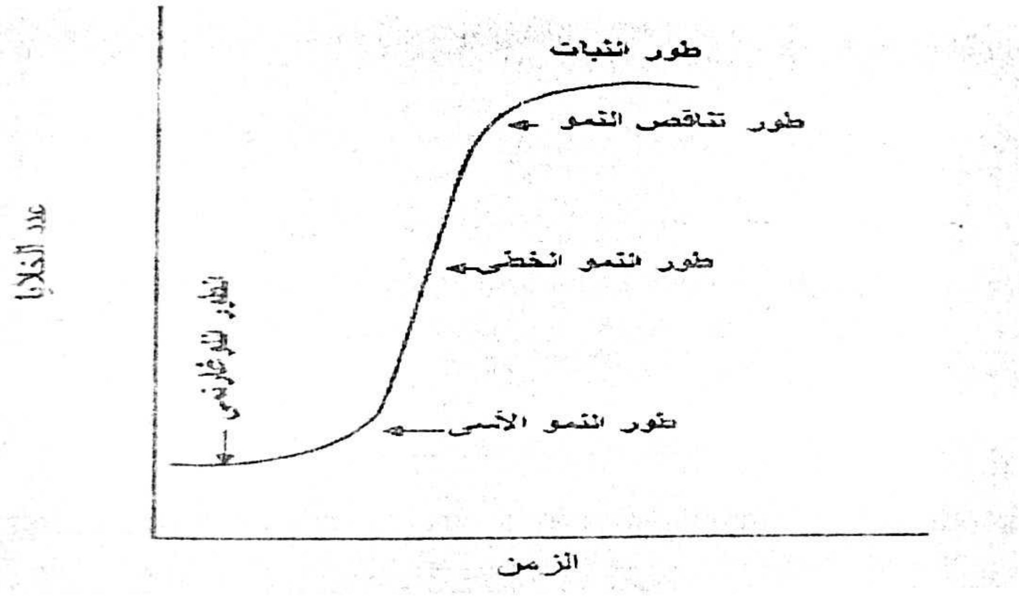
يعتبر الحصول على المعلق الخلوى من الإجراءات الروتينية لبعض معامل الإكثار الدقيق وكل معامل إنتاج المواد الفعالة معملياً. وعند إعداد المعلق الخلوى يجب

التأكد من الكثافة الأولية المستعملة أو على الأقل وجود حد أدنى من نواتج عمليات الأيض لهذه الخلايا والتى يمكن الحصول عليها باستعمال بيئة سبق أن استعملت فى نمو خلايا أخرى فيما يعرف بـ conditioned media. وقد تبقى الخلايا حية لكن لا تنقسم وتطول فترة الطور اللاجى Lag إذا لم يتحقق شرط الحد الأدنى من الكثافة الخلوية أو استعمال بيئة تحتوى على بعض نواتج عمليات البناء الضرورية. وعند إعادة تقسيم الخلايا لا بد من المحافظة على الحد الأدنى للكثافة الخلوية. فإذا كان حجم اللقاح المتاح قليل ويراد استعماله للحصول على حجم كبير من المعلق الخلوى فيتم تنمية اللقاح فى حجم قليل من البيئة يزيد تدريجيا حتى يصبح مناسب لتلقيح حجم كبير.

ويتم الحصول على كالس مناسب لتكوين المعلق الخلوى بعد تنميته لمدة ٤-٦ دورات على بيئة شبه صلبة وبشرط التأكد من ثبات معدل النمو والذى يشير إلى تأقلم الكالس مع بيئة الزراعة. يقطع الكالس إلى قطع صغير إذا كان صلب أو يفصل منه أجزاء صغيرة باستعمال الملاقط إذا كان هشاً وتنقل الأجزاء إلى البيئة السائلة التى توضع على جهاز هزاز دائرى. والكالس الهش أفضل لتكوين المعلق الخلوى لأن الكالس الصلب يستغرق فترة أطول لتكوين المعلق الخلوى. ويجب أن يحتوى المعلق القياسى على الخلايا فى صورة فرديه وليست فى صورة مجموعات، لذا قد تستخدم أنواع من الدوارق المخروطية مزودة بزوائد داخلية للمساعدة على تفتيت هذه الكتل (aggregates). لكن من النادر الحصول على معلق خلوى محتوى على خلايا فردية فقط إذ أنه فى الغالب يحتوى على مجموعات من الخلايا بأقطار تتراوح بين ١٠٠-١٠٠٠ ميكروميتر.

وعند إعادة تقسيم وزراعة المزرعة تزال كتل الخلايا الكبيرة من المعلق بالترشيح بقطعة من القماش المعقم ذات أقطار ٠.١-٠.٥ مم. وتعتبر هذه الخطوة ذات أهمية بالذات فى المراحل الأولى من إعداد المعلق الخلوى. تختلف الطرق المستعملة

لإعادة تقسيم وزراعة المعلق الحلوى على حسب الغرض من المزرعة وكذلك بين المعامل المختلفة وهل تتم إعادة الزراعة للمحافظة على النمو فقط، أم للحصول على سلالة خلوية ثابتة. يمكن أيضاً الحصول على المعلق الخلوى مباشرة من النسيج النباتى والذى يفضل أن يكون أجزاء من البادرة أو حتى البذرة بهرس النسيج يدويا أو باستخدام جهاز الخفق homogenizer ثم يرشح الناتج لحجز الكتل الكبيرة. بعدها يتم الطرد المركزى للراشح وينقل الراسب إلى البيئة. وتستعمل أيضاً الإنزيمات كالبكتينيز لهدم مكونات الجدر الخلوية فتنفصل الخلايا عن بعضها. لكن من الناحية العملية يفضل الحصول على مزارع المعلق الخلوى من الكالس. ويبين شكل رقم (٦-١٤) مراحل نمو الخلايا فى المعلق الخلوى.



شكل ٦- ١٤: مراحل نمو الخلايا فى المعلق الخلوي (Stafford & Warren, 1991).

يفضل أن يتم إعادة زراعة المعلق الخلوى فى نهاية الطور التضاعفى Exponential من مراحل النمو، ويتم ذلك بنقل حجم مناسب من المعلق الخلوى إلى حجم محدد من البيئة الجديدة وبمعدل زمنى ثابت. وكما سبق القول الحجم المستعمل كلقاح لا بد أن يحتوى على عدد من الخلايا أعلى من الحد الأدنى الضرورى للنمو، فعلى

سبيل المثال يستعمل لقاح بنسبة ١:٥ من المعلق الخلوى لخلايا نباتات *Catharanthus roseus*. ومن الأفضل ترشيح المعلق واستخدام ٥ جم وزن رطب من كتل الخلايا والخلايا لتلقيح ١٠٠ مل من البيئة فى حالة احتواء المعلق الخلوى على كتل من الخلايا ذات أقطار أكبر من ١ مم. ويتحقق الحصول على خلايا ذات تباين قليل بإجراء إعادة الزراعة على فترات قصيرة مثلاً كل ١٤ يوم (Collin & Edward, 1998).

وكما هو فى زراعة الكالس يجب تدوين كافة البيانات على كل دورق من حيث نوع المزرعة، والتاريخ، ومعدل النمو، والحجم المستخدم للزراعة، الخ. ويلاحظ أن الخلايا النباتية أثناء المراحل الأخيرة من دورة الخلية - وعلى العكس من الخلايا البكتيرية- تكون كبيرة الحجم وذات جدار خلوى صلب وفجوات عصارية كبيرة الحجم. هذه المواصفات تجعل الخلايا حساسة للإجهاد التقسيمى Shear stress. وعلى هذا يجب تحريك المعلق الخلوى برفق حتى لا يحدث ضرر للخلايا ويتم ذلك باستعمال هزاز ذو قوة منخفضة ٥٠-٢٠٠ لفه/دقيقة. لكن تكون هذه السرعة المنخفضة سبباً فى عدم الخلط الجيد للمزرعة مما يؤثر فى عمليات الأيض. ومن ثم فإن معدل النمو وحجم اللقاح والحساسية للحركة لا بد وأن تؤخذ فى الاعتبار عند استعمال المعلق الخلوى فى الأغراض المختلفة.

ويمكن تقليل التباين الحادث فى الكالس بدرجة كبيرة باستخدام نظام المعلق الخلوى حيث تكون كل الخلايا منغمسة داخل وسط النمو للتغلب على التدريج الحادث فى مكونات البيئة ونواتج عمليات البناء بين الخلايا والبيئة. لكن لسوء الحظ لا يمكن الحصول على درجة تماثل تام حتى فى المعلق الخلوى حيث أن الخلايا النباتية تميل إلى النمو فى صورة مجموعات وليست خلايا فردية. ورغم أن هناك بعض الطرق تتبع للحصول على معلق خلوى ذو كتل خلايا دقيقة الحجم أى مكون من خلايا فردية فإن المعلق لا يستمر على ذلك لمدة طويلة، وتحتوى اغلب المعلقات الخلوية على كتل صغيرة

من الخلايا. يؤدى احتواء المعلق على كتل كبيرة الحجم من الخلايا إلى عدم التماثل كما هو الحال فى زراعة الكالس. ومازال هناك جدل خول نوعية المعلق الذى يفضل استعماله فمن الناحية النظرية المعلق الدقيق يفضل فى حالة إنتاج المركبات الثانوية، لكن من الناحية التطبيقية بعض نواتج عمليات البناء لا يتم تخليقها فى المعلق الدقيق لكن يرتبط معدل تخليقها بحدوث درجات معينة من التكشف والتى لا تتم إلا فى حالة وجود كتل من الخلايا (Stafford & Warren, 1991).

نمو معلق الخلايا

فى الظروف العادية تزداد الخلايا النباتية فى الحجم ثم ما تلبث أن تنقسم مكونة خليتين لهما القدرة على النمو والانقسام. وإن لم تكن الظروف البيئة مهيأة للنمو والانقسام كارتفاع أو انخفاض الرقم الهيدروجينى للبيئة أو وجود مواد سامة أو تراكم بعض نواتج عمليات الأيض المثبط للنمو فإن الخلية يمكنها المحافظة على حيويتها دون انقسام. ويقاس النمو على مستوى الخلايا الفردية بحدوث دورة النمو الكاملة للخلية أما على مستوى العشيرة الخلوية فإن النمو يمكن أن ينظر إليه فى صورة دورة النمو فى بعض الأنواع النباتية وتكون الاختلافات الوراثية بين النباتات الناتجة من الكالس أو المعلق الخلوى كبيرة، رغم اعتبار ذلك مشكلة من ناحية الإكثار الخضرى. وفى البداية اعتقد أن المعلق الخلوى قد يكون هو الوسيلة الناجحة لإكثار العديد من النباتات خاصة الأشجار التى تكون فى الغالب متضاعفة.

إلا أنه بسبب التباين الوراثى العالى لا تعد هذه هى الوسيلة المستهدفة لإكثار الكثير من النباتات، لكن لهذا التباين أهمية كبيرة من وجهة نظر مربى النبات كمصدر للتباين الوراثى، ويمكن بالرجوع إلى (Dix, 1990) معرفة التطبيق العملى لمزارع المعلق الخلوى فى إنتاج العديد من الأصناف المقاومة لكثير من الإجهادات البيئية أو الحيوية. ولحسن الحظ يبدو أن النبيتات المستولدة من كالس له قدرة تكشفية عالية تكون

ثابتة وراثياً بدرجة أكبر من تلك الناتجة من كالس له قدرة تكشفية أقل. ويجب الحرص على عدم استعمال أنسجة بها تضاعف داخلى endoreduplication للإكثار. كما يجب تجنب إضافة تركيزات عالية من منظمات النمو المشجعة على التباين الوراثى مثل 2,4-D. وهناك عديد من الطرق التى تستعمل لقياس النمو فى المعلق الخلوى ويتوقف استعمال أى منها على طبيعة المعلق والخلايا وهل يحتوى على خلايا فردية غالبا أم على كتل خلوية وكذلك الغرض من زراعة المعلق وهذه الطرق هى:

١. **الوزن الطازج والجاف:** ويعتمد على تقدير كتلة النمو الحيوى بوزن الخلايا الطازجة بحيث توضع ورقة ترشيح مشبعة بالبيئة المستخدمة فى الزراعة ومعلومة الوزن فوق قطعة من القماش على قمع Buchner .ثم يقدر وزن الخلايا بعد الترشيح تحت تفريغ. وبغسيل الخلايا فوق ورقة الترشيح وتجفيفها على ٦٠°م يمكن حساب الوزن الجاف للخلايا فى حجم معلوم من البيئة. مع الأخذ فى الاعتبار أن النمو يتوقف على حجم البيئة المستعملة فى نمو المعلق. وبتكرار أخذ عينات من المعلق على فترات ثابتة وهى ثلاثة أيام غالباً وتوقيع النتائج بيانياً يمكن الحصول على منحنى النمو للمعلق. لكن قد تكون النتائج مضللة فتراكم نواتج الأيض كالنشا داخل الخلايا يزيد وزنها لكن لا يمكن اعتبار ذلك زيادة فى النمو بصورة مطلقة. لذا ينصح بإجراء قياس آخر كعد للخلايا بجانب قياس الوزن الطازج والجاف

٢. **عدد الخلايا:** يبدأ نمو الخلايا النباتية فى المعلق الخلوى بالطور اللاجى ثم الأسى ثم الثبات وينتهى بطور الموت. وتكون الزيادة فى عدد الخلايا قليلة لكن بمعدل نشاط أيضى واضح فى الطور اللاجى والذى تتوقف مدته على حجم اللقاح الموجود بالبيئة. ثم تدخل الخلايا فى الطور الأسى ويزيد عددها مع زيادة فى وزنها الطازج والجاف. ويعبر طور الموت عن الخلل فى مكونات البيئة أثناء نمو المزرعة وباستنفاذ مكوناتها أو بزيادة تراكم نواتج الأيض السامة. وتحت ظروف النمو المثلى يزيد عدد الخلايا فى

المعلق بطريق لوغارتمية ثابتة، فبفرض أن عدد الخلايا الأساسى فى المعلق هو "ن" فإن عدد الخلايا فى المعلق الخلوى يزيد ليكون"٢ن" ثم "٤ن" ثم "٨ن" وهكذا. ويقدر عدد الخلايا باستخدام المجهر وشريحة العد المستخدمة لعد كرات الدم haemocytometer عقب تكسير الكتل الخلوية فى المعلق الخلوى إلى خلايا فردية باستعمال محلول chrominum trioxide أو إنزيم البكتينيز على أن يستخدم محلول منظم للضغط الأسموزى للمحافظة على حجم الخلايا. ويمكن تخزين العينة لمدة تصل إلى أسابيع أو يتم القياس فوراً على أساس نوع المعلق بعد التخفيف بالماء لنصل إلى ٢٠٠ خلية تقريباً لكل ١٠ ميكروليتر.

٣. **حيوية الخلايا:** وذلك بقياس قدرة الغشاء البلازمى على تجميع أو منع دخول بعض الصبغات حيث يقاس التحليل الإنزيمى المائى فى الغشاء البلازمى للمركبات ذات الوميض الضوئى مثل fluorescien diacetate والذى ينتج عنه تراكم مركبات fluorescein ذات الوميض الأخضر المميز للخلايا الحية عند تعريضها لأشعة طولها الموجى ٣٦٠ أنجستروم. كذلك فإن استعمال الصبغ بصبغة Evans blue يؤدى إلى صبغ الخلية غير الحية فقط. وبذلك يمكن تقدير النسبة المئوية للحيوية بنسب عدد الخلايا الحية إلى العدد الكلى للخلايا كما يمكن قياس الحيوية بالفحص المجهرى الدقيق على أساس القياس الميكروسكوبى للغشاء الخلوى، النواة، تدفق السيتوبلازم. ويمكن استخدام هذا المقياس كدليل للنمو لكن حيوية الخلايا لا تعنى بالضرورة قدرتها على النمو والتكشف.

٤. **الحجم المعبأ للخلايا Packed cell volume**: وهو يعبر عن الحجم الفعلى للخلايا لكن يجب ألا يحتوى المعلق الخلوى على كتل من الخلايا. يؤخذ حجم معلوم من المعلق الخلوى ويوضع فى أنبوب طرد مركزى مستدق الشكل ومدرج. ويتم الطرد المركزى حتى تمام الترسيب ويقدر حجم الراسب ثم يعبر عن حجم الخلايا المعبأ

منسوباً إلى الحجم الكلى للعينة. ويمكن استخدام نفس العينة لتقدير الوزن الرطب والجاف وعدد الخلايا.

٥. **المكونات الحيوية للخلايا Cell biocompounds:** باستخدام محتوى الخلية من البروتين أو الأحماض النووية أو النتروجين بالطرق المعروفة. وتمثل هذه المواد نسبة ثابتة من الوزن الجاف.

٦. **معامل الانقسام الميتوزى Mitotic index (MI):** يتم الانقسام الميتوزى فى عدة مراحل هى Prophase و Metaphase و Anaphase و Telophase) التمهيدى، والاستوائى، والانفصالى، والنهائي). وفى النهاية تتكون خليتان جديدتان. وبذلك ينتج عنه نمو مباشر فى الكائن بزيادة عدد الخلايا مع المحافظة على عدد الكروموسومات بها وهو أحد مؤشرات النمو الفعلى. ويمكن بسهولة تمييز الخلايا التى دخلت مرحلة الانقسام الميتوزى عن تلك التى فى مرحلة Interphase بالميكروسكوب الضوئى حيث تكون الكروموسومات مندمجة قصيرة الطول ويسهل رؤيتها وعدها بعد صبغها بصبغات تصبغ الحامض النووى. يلاحظ أن زمن الانقسام الميتوزى يكون قصيراً نسبياً مع الدورة الكاملة للخلية ويعبر معامل الانقسام الميتوزى MI عن عدد الخلايا التى توجد فى مرحلة الانقسام منسوباً إلى العدد الكلى من الخلايا وهو مقياس بسيط وذو دلالة هامة فى قياس النمو لكنه يتطلب وقتاً.

٧. **تقدير مكونات البيئة والتوصيل الكهربى:** يعتبر استنفاذ المكونات المختلفة للبيئة من الطرق التى يمكن استخدامها لقياس النمو. لكن يجب الحذرفاستهلاك بعض المواد كالفوسفات قد يفسر بطريقة خاطئة. كما يمكن قياس الذائبات الخلوية التى ترشح من الخلية إلى البيئة والذى يعكس حيوية الغشاء الخلوى ويتم ذلك بقياس التوصيل الكهربى للبيئة وهناك علاقة عكسية بين شدة التوصيل الكهربى والنمو. ويشيع

استخدام هذا المقياس فى حالة استعمال المفاعلات الحيوية Bioreactor لإنتاج الموارد الفعالة.

خامساً : البذور المصنعة

يعتقد أن الأجنة الجسدية ستكون الطريقة المثلى لتطبيق زراعة الأنسجة فى الإكثار التجارى للعديد من الحاصلات الاقتصادية. ويمكن أن تزرع الأجنة الجسدية مباشرة فى التربة لكن بنسبة إنبات ونجاح ضعيفة وغير اقتصادية. ومن ثم اتجه العلماء إلى دراسة إمكانية إنتاج أجنة مغلفة يطلق عليها البذور المصنعة artificial seeds أو Synthetic seeds وبذلك يمكن نقلها وتداولها وزراعتها كبذور عادية. وذلك باستعمال مادة مغلفة تغلف الجنين الجسدى وتحفظه من الظروف البيئة غير المناسبة مع إضافة بعض المواد المغذية ومنظمات النمو الضرورية لإنبات الجنين فى الحقل، وربما تعامل البذور ببعض المبيدات للحماية من الكائنات الدقيقة بالتربة. لكن يبين Ganapathi*et al.* (2001) أن تلك المواد المضافة بمثابة بديل للاندوسبرم قد تؤثر على معدل بقاء أجنة الموز، وأيضاً كان للسكر تأثير سالبى فى بيئة الزراعة على حياة العقد الساقية لنباتات Yam المغلفة، لكن بزيادة تركيز السكر فى الطبقة المغلفة ثبط تكوين البلورات الثلجية أثناء الحفظ البارد للبذور (Danso & Ford-Lloyd, 2003) . وبذلك زاد معدل البقاء.

وعموماً يجب أن تضمن المادة المغلفة حماية الجنين أثناء التخزين والنقل وعمليات الزراعة، لكنها فى نفس الوقت لا تعيق نمو الجنين ولا تسبب أى سمية، ومن البديهى أنها لا تشجع نمو الكائنات الدقيقة. ويفضل أن تنتج البذور المصنعة بطريقة تضمن استعمال نفس الآلات التقليدية فى عمليات الزراعة، لكن من الأهمية استعمال أجنة متماثلة بقدر الإمكان ويمكن تحديد الأجنة المثلى للتغليف بطريقة بصرية أو بالاعتماد على الكثافة النوعية. ولصعوبة إنتاج الأجنة الجسدية فى بعض النباتات قامت العديد من الدراسات باستخدام نفس الفكرة فى تغليف العقد الساقية (شكل رقم٦-١٥) أو القمم

الميرستيمية وربما الكالس، وتكاليف إنتاج البذور المصنعة باستعمال هذه المُستأصَلات أقل بكثير عن استعمال الأجنة الجسدية (Rao, 2004) . وبالمثل تستخدم تلك البذور للزراعة مباشرة فى الحقل أو للحفظ فى النتروجين السائل كأحد الطرق الحديثة لحفظ الأصول الوراثية (Engelmann &Engels, 2002 & Razdan, 2002).

وهناك نظامين لإنتاج البذور المصنعة يعتمدان على نفس الفكرة، الطريقة الأولى ويطلق عليها desiccated synthetic seeds حيث يتم نزع الرطوبة من الغلاف المحيط بالجنين. وقد ابتكرت على يد Kitto & Janick (1982) ومن بين المواد التى ثبت نجاحها لهذا الغرض polyoxyethylene (Polyox r) التى تذوب فى الماء ثم تجفف فى الهواء لتكون غشاء رقيق حول الجنين. ويمكن خلط محلول تركيزه ٥% من هذه المادة مع حجم مماثل من معلق الأجنة ثم يتم نشر الخليط فى قطرات حجمها ٠.٢ مل على رقائق Teflon فى كابينة الزراعة وتترك لتجف حيث تستغرق وقت قد يصل إلى خمس ساعات، ويعرف ذلك بسهوله انفصال البذور فى شكل رقائق هشة من على السطح السابق. ويعاد زراعة البذور بعد رفع محتواها المائى بنشرها فى بيئة الزراعة مرة أخرى.

أما الطريقة الثانية وتسمى hydreated synthetic seeds وقد ابتكرها Redenbaugh *et al.* (1984) وقد حلت محل الطريقة الأولى بشكل واسع. ومن بين المواد التى استعملت لهذا الهدف الجينات الصوديوم حيث يتم خلط محلول ٢% من الجينات الصوديوم مع الأجنة الجسدية أو المُستأصَلات الأخرى ثم تقطير هذا الخليط فى ١٠٠ مليمول من نترات الكالسيوم وربما يستعمل كلوريد الكالسيوم بنصف التركيز السابق. فيحل أيون الكالسيوم محل الصوديوم ويتكون سريعاً سطح هلامى حول المُستأصَل تزيد قوته تدريجاً خلال نصف ساعة. وللتحكم فى حجم القطرات يمكن قطع طرف الماصات البلاستيكية بطول مناسب لحجم القطرة وحجم المُستأصَل. لكن يلاحظ

صعوبة تداول البذور الناتجة وقد تلتصق معاً مع صعوبة وضع الجنين فى منتصف البذرة. وقد ابتكرت فعلاً بعض الأجهزة الأوتوماتيكية التى تستخدم لإنتاج كبسولات تحتوى أجنة جنين فردية معدة للزراعة. ومن الأمثلة الناجحة لاستعمال هذه التقنية إنتاج بذور مصنعة لنباتات الشاى بواسطة .Mondal *et al.* (2004)

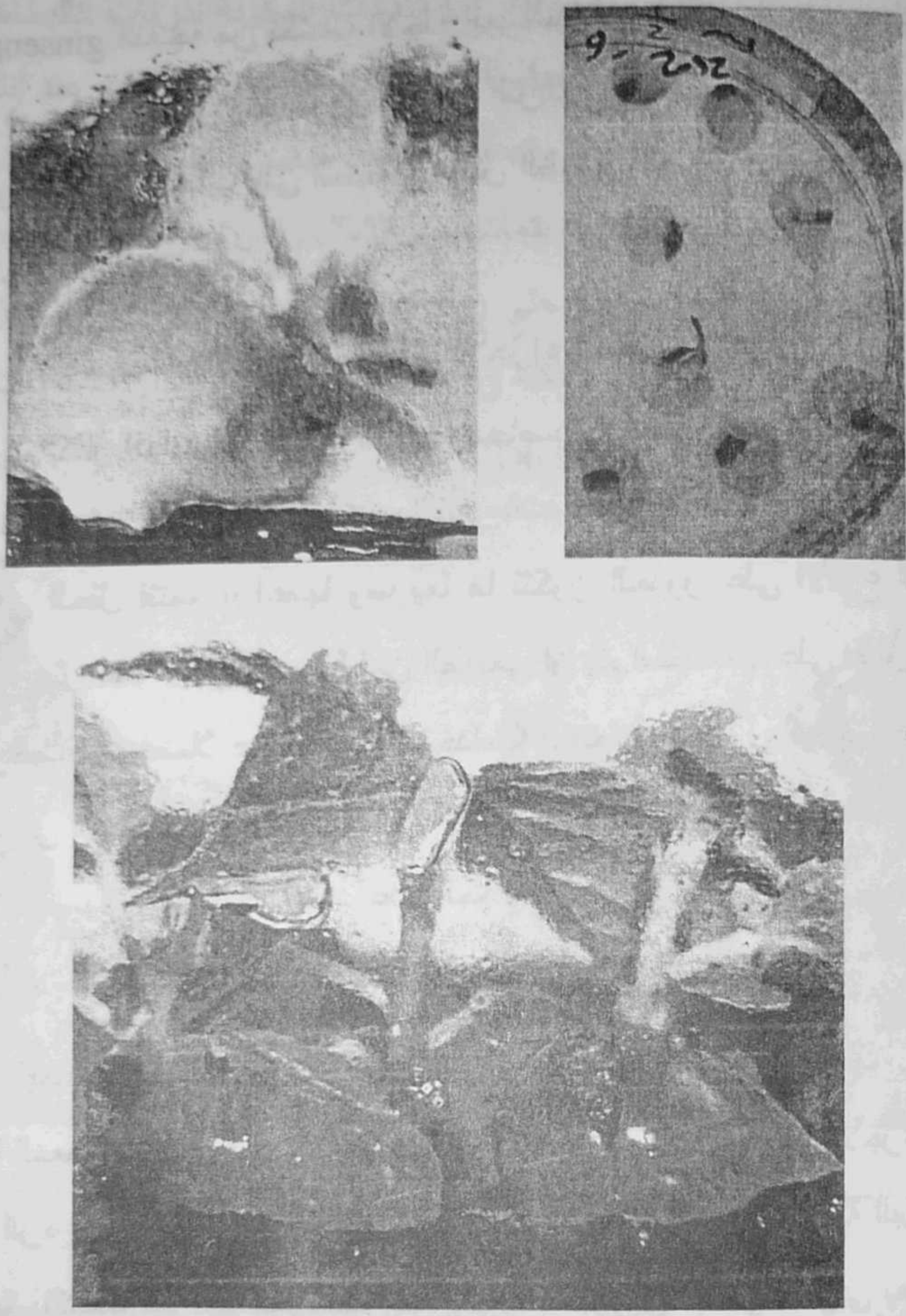
لكن أشار(2000) Chawla و (2002) Razdan إلى العديد من الصعوبات التى تحول دون الاستعمال التجارى لهذه الطريقة فى الإكثار الدقيق وهى:

١. إنتاج البذور المصنعة باستخدام الأجنة الجسدية ذات القدرة على الإنبات لمدة طويلة عملية مكلفة وتحتاج الكثير من الإمكانيات.
٢. ضرورة حفظ البذور من الجفاف أثناء التخزين حتى لا تدخل الأجنة فى دور سكون.
٣. يجب حماية الجنين من الكائنات الدقيقة.
٤. انخفاض نسبة إنبات الأجنة من البذور المصنعة ويرجع ذلك إلى عدم التكوين التام للجنين وصعوبة إيقاف النمو أثناء التخزين وعدم ملائمة المواد المخزنة فى البذرة أحياناً لإنبات الجنين كالإندوسبرم العادى. ومن ثم يجب إجراء بعض المعاملات للمساعدة فى تحسين إنبات البذور المصنعة فبذور الجزر على سبيل المثال تعامل ١٢% سكر أوالمعاملة بالبرودة أو حامض ABA بالإضافة لزيادة معدل التقاوى.

أهمية استخدام الأجنة العرضية فى برامج تربية النبات

سبق القول أن زراعة الأنسجة تلعب دوراً هاماً فى تربية النبات، لكن للأجنة العرضية أهمية خاصة فى تربية النبات تتحقق فيما يلى:

١. فرصة العثور على اختلافات وراثية أكبر حيث أن كل نبات ناتج من خلية واحدة على العكس من تكشف الأشطاء. مع عدم وجود كيميرا فى النسل الناتج لأن كل خلايا الفرد ناتجة من خلية تحمل نفس الطفرة. وعلى الرغم من هذا فإن التغيرات الوراثية فى مزارع الأجنة العرضية أقل من تلك الحادثة عند تكشف الأشطاء.
٢. إمكانية إنتاج نباتات خالية من الفيروس فى بعض النباتات التى يصعب إكثارها باستعمال مزارع القمم الميرستيمية كبعض أصناف الموالح خاصة تلك التى لا تكون بذور.



شكل ٦-١٥: البذور المصنعة من العقل الساقية لنباتات التين باستعمال٣% من الجينات الصوديوم (أعلى يمين ولاحظ عدم انتظام شكل البذور وصعوبة جعل الجنين فى الوسط). وفى اليسار بدء الإنبات عقب الزراعة، وفى الأسفل البذور عقب تمام الإنبات مع ملاحظة تكوين الكالس.

يمكن باستخدام الأجنة العرضية تقصير فترات برامج التربية خاصة فى النباتات المتميزة بطول فترة الصبا مثل الأشجار حيث تتجه النباتات الناتجة إلى الإزهار المبكر،

فنباتات ginseng الناتجة من تكشف الأجنة العرضية من الجذور أزهرت مباشرة عقب الإنبات وهو ما وفر ثلاث سنوات من برنامج التربية فى الظروف العادية (Ahn *et al.*, 1996). وكذلك عدم الحاجة إلى استخدام بعض الظواهر الوراثية كظاهرة العقم الذكرى فى الإكثار لإنتاج الهجن.

سادساً: الإكثار باستعمال الأجزاء المخزنة للغذاء

يتم إكثار العديد من نباتات الزينة ومحاصيل الخضر خضرياً باستعمال الأجزاء المخزنة للغذاء كالأبصال، والدرنات، والكورمات، الجذورالمتدرنة. فتزرع تلك الأجزاء مباشرة فى الحقل فتنمو براعمها وسريعاً ما تتكون الجذور على الأفرع النامية. وإذا أمكن إنتاج مثل هذه الأجزاء معملياً فمن الطبيعى أن يتم استخدامها على نطاق تجارى فى الإكثار الخضرى، فضلاً عن إمكانية استخدامها فى حفظ الأصول الوراثية. ولعل الميزة الواضحة فى ذلك هى التغلب على مشكلة الأقلمة فالأعضاء المخزنة للغذاء تتحمل نسبياً الظروف القاسية. أضف إلى ذلك عدم الحاجة لمرحلة تكوين الجذور معملياً قبل نقل النباتات للبيت المحمى وسهولة عمليات النقل والتخزين والزراعة.

ويمكن للنباتات التى تكون أبصال فى ظروف النمو الطبيعية تكوين أبصال فى الزراعة المعملية من البراعم الجانبية أو العرضية والتى تتكشف على الأجزاء الورقية أو الحامل الزهرى أو حتى من المبايض. وفى بعض الأنواع يجب إزالة البرعم الطرفى لأنه يعيق تكشف البراعم العرضية على قواعد الأوراق المخزنة. وفى بعض الحالات كما فى أبصال النرجس والبصل والثوم يجب أن يتضمن الجزء المنزرع جزء من الساق القرصية للبصلة حتى يتسنى تكوين البراعم العرضية ومنها تتكون الأبصال كما هو مبين فى الشكل رقم (٦-١٦). وقد أمكن الحصول على كورمات الجلاديولس عند زراعة أجزاء من الكورمة، وبإعادة تقسيم وزراعة الكورمة المتكشفة تكونت كوريمات جديدة. وأمكن كذلك إنتاج كوريمات كالسات الجلاديولس عقب زراعة أجزاء مختلفة منه

(George, 1993) و (Razdan, 2002). أما النباتات المكونة لدرنات كالبطاطس فمن الممكن الحصول على الدرنات واستخدامها فى الإكثار التجارى وبالذات عند إنتاجها من قمم ميرستيمية خالية من الفيروس. وقد أصبح هذا هدف أساسى لبعض برامج إنتاج التقاوى حيث تمتاز الدرنات المتكشفة بتماثلها فى الشكل واللون مع تلك الناتجة فى الحقل مع سكونها الفسيولوجى لمدة طويلة حتى زراعتها فى الحقل، فيمكن بذلك تخزينها مدة طويلة ونقلها من مكان لأخر دون مشكلة وبزراعة الدرنات فى الحقل نمت نباتات عادية مشابهة للأصل (Donnelly *et al.*, 2003).




شكل ٦-١٦: فى اليمين تكوين درينات البطاطس فى بيئة شبه صلبة وفى اليسار إنبات البراعم عقب كسر السكون.

ولدفع المزارع المعملية لهذا المسلك يتم تعديل تركيز السكر ومنظمات النمو وكذلك الضوء، ودرجات الحرارة أثناء الإكثار الدقيق. ولقد انصبت الكثير من الدراسات على إنتاج الدرنات الدقيقة للبطاطس فى المعمل كطريقة تجارية لإكثار نباتات البطاطس الناتجة من زراعة القمم الميرستيمية لضمان خلوها من الفيروسات خاصة فى البلدان التى تعانى من مشاكل عدم وجود مناطق معزولة لإنتاج بذور البطاطس (Donnelly *et al.*, 2003). ويتم ذلك بزراعة العقل الساقية فى بيئة تحتوى على تركيز عالى من السكر

يتراوح بين ٦ و ١٠% مع خفض درجة الحرارة إلى ١٥-١٨°م وربما يضاف السيتوكينين للبيئة. وباستخدام المفاعلات الحيوية أمكن تقليل تكاليف الإنتاج بشكل كبير.

سابعاً : مزارع المتك وإنتاج النباتات الأحادية

يتم أثناء المراحل الأولى من التكاثر الجنسى اختزال عدد الكروموسومات فى المشيج المذكر والمؤنث إلى النصف نتيجة للانقسام الاختزالى meiosis. وإذا أمكن لهذه الخلايا أن تنمو لتعطى نبات فإنه بالطبع سيحتوى على نصف العدد الكروموسومى المميز للنوع. ويحدث ذلك فى الطبيعة بمعدل قليل للغاية لا يزيد عن ٠.٠١% حيث تكون البويضة جنين دون اخصاب فيما يعرف بظاهرة parthenogenesis. ومن النادر أن تتطور نواة حبة اللقاح إلى جنين فى الكيس الجنينى دون أن تشاركها البويضة فى ذلك فيتكون جنين أحادى يحمل صفات النبات الأب. وحتى عام ١٩٦٤ اقتصر انتاج النباتات الأحادية على بعض المعاملات كقتل نواة حبة اللقاح قبل التلقيح بالتشعيع، أو باستعمال بعض منظمات النمو، وكذلك بدرجات الحرارة المنخفضة. إلا أن هذه الطرق لم تكن فعالة بصورة عملية. وفى سنة ١٩٥٣ أشار Tulecke إلى أن الأنسجة المحتوية على نصف العدد الكروموسومى المميزة للنوع كحبوب لقاح نباتات الداتورة يمكن أن تستخدم كمصدر لزراعة الأنسجة ويتكشف عنها نباتات أحادية العدد الكروموسومى فيما يعرف بـ androgenesis. وتطور استخدام مزارع المتك فى إنتاج النباتات الأحادية تطور سريع ليغطى العديد من العائلات النباتية.

وتكمن فائدة النباتات الأحادية فى استخدامها لإنتاج نباتات ثنائية نقية homozygous فى كثير من المحاصيل خلطية التلقيح فى خطوة واحدة حيث يتم مضاعفة العدد الكروموسومى للنباتات الناتجة باستعمال الكولشيسين. وفى برامج التربية التقليدية يتطلب هذا الأمر إجراء التربية الداخلية inbreeding لعدد كبير من الأجيال يختلف باختلاف النوع، ويعتبر ذلك مهم جداً فى تربية النباتات التى تتميز بطول فترة

الجيل كأشجار الفاكهة ونباتات الغابات وبعض الأبصال. كما يمكن استعمال مزارع المتوك فى إنتاج نباتات بها صور مختلفة من التضاعف غير التام ويمكن إكثارها خضريا. وأمكن فعلاً باستخدام مزارع المتوك إنتاج أصناف محسنة من الدخان والقمح والأرز وغيرها من المحاصل (Chawla, 2000). كذلك أشار إلى الحصول على هجن فائقة الذكورة (Y) لنباتات *Aspargas* تمتاز بإنتاجيتها العالية وذلك بإنتاج نباتات مذكرة أحادية ثم مضاعفتها بالكولشيسين لإنتاج نبات (YY) ثم تلقيحها مع إناث (XX) لإنتاج هجن ذكور خليط (XY). ويمكن الحصول على النباتات الأحادية فى زراعة الأنسجة بثلاثة طرق: ١) زراعة الجاميطات المذكرة،٢) زراعة خلية البويضة ويطلق على هذه الحالة gynogensis لكن تعتبر الطريقة الأولى أكثر فاعلية من الثانية والتى يميزها قلة عدد النباتات الالبينو الناتجة فى نباتات العائلة النجيلية، وإن كان ذلك يرتبط بالطرز الوراثى للنبات (Reed, 2005)، ٣) إجراء التلقيح الكاذب للجاميطات المؤنثة وقد اتبع ذلك فى تلقيح نباتات *Torenia fournieri* بحبوب لقاح من نبات *Mimulus luteus* حيث تطورت البويضة إلى جنين دون حدوث إخصاب ويميز هذه الطريقة الثبات الوراثى العالى للنباتات، وقد استخدمت هذه الطريقة لأول مرة فى إنتاج نباتات أحادية من الكيس الجنينى لنباتات الشعير.

لكن يجب الإشارة هنا إلى التباين بين النباتات الأحادية الناتجة من نفس النبات الثنائى، كما هو الحال فى التباين بين الجاميطات الناتجة من نفس النبات. وقد حدد Neumman *et al.* (2009) ثلاث طرز مختلفة لشكل أوراق نباتات الدخان الأحادية الناتجة من نبات واحد عقب مضاعفتها وذلك لوجود بعض الجينات المتنحية المختلفة بالطرز الثلاثة. وكانت الطرز الثلاثة خصبة وحافظت على نفس شكل الأوراق المميز لها لعدة أجيال من التكاثر الجنسى. وقد لوحظت قوة الهجين عند تهجين سلالتين من هذه النباتات مع بعضهما. وسوف نستعرض هذه الطرق بإيجاز شديد وللمزيد من التفصيل

والاختلافات بين الأنواع النباتية راجع Bohajawni & Razdan (1996) وكذلك Neumann *et al*. (2009).

١. استعمال الجاميطات المذكرة

أو ما يعرف بزراعة المتك أو الخلايا الجرثومية المفصوله منه حيث تتكون النباتات بطريقة androgenesis. والأساس العلمى لهذه العملية هو دفع حبوب اللقاح أو الخلايا الأمية لحبوب اللقاحpollen microspores لتكوين أجنة جسدية أى أنسجة خضريه بدلاً من حبوب لقاح ناضجة. وربما يشاهد تكوين الجذور والأشطاء ثم يحدث ارتباطهما معاً لتكوين النبات الاحادى (Neumann *et al*., 2009). ويتم هذا التغيير من الحالة الطبيعية التى تؤدى إلى تكوين الجاميطات الجنسية المذكرة إلى تكوين أنسجة خضرية تحت ظروف معينة وفى مرحلة مبكرة من مراحل دورة الخلية حيث يتم وقف نسخ وترجمة الجينات المسئولة عن تكوين الطور الجاميطى وتنشيط نسخ وترجمة الجينات المسئولة عن تكوين الأنسجة الخضرية. فبدلاً من أن تتكون حبوب لقاح تكون الخلية الأمية لحبوب اللقاح أجنة أحادية مباشرة direct regeneration أو تكون أنسجة كالس تتكشف منها أجنة أو أشطاء indirect regeneration. لكن لا تفضل هذه الطريقة للتكشف غير المباشر حيث تتكون بعض نباتات الأحادية من الأنسجة الجنسية ونباتات ثنائية من الأنسجة الجسدية المجاورة لها.

وعموماً قد يكون تكشف الكالس عائقاً أمام تكوين النباتات الأحادية. وتتكون النباتات الأحادية بسرعة أكبر عند زراعة أنسجة المتك متضمنة الخلايا الأمية الذكرية بدلاً من زراعة حبوب اللقاح فقط، فوجود أنسجة المتك يساعد فى انقسام الخلايا بطريقة يعتقد أنها غذائية أو هرمونية. لكن بصورة عامة فإن إمكانية تكوين النباتات الأحادية باستخدام حبوب اللقاح غير كبير وينحصر معظمها فى متك النباتات التابعة للعائلة الباذنجانية أو حبوب اللقاح لبعض نباتات عائلات Cruciferae, Gramineae و Ranunculaceae. لقد تم الحديث سابقاً عن العوامل المؤثرة فى مزارع الأنسجة بصورة

عامة، لكن هناك العديد من العوامل الخاصة بمزارع المتك ويلعب الطرز الوراثى دوراً محورياً فى ذلك. ولعل من الضرورى استعراض تلك العوامل بإيجاز قبل الخوض فى طرق الحصول على نباتات أحادية بطريقة androgensis، ولمزيد من التفاصيل يمكن الرجوع إلى Bhojwani & Razdan (1996).

أ. **الحالة الفسيولوجية للنبات الأم وظروف النمو:** كقاعدة عامة يجب أخذ البراعم المبكرة والنبات صغير العمر. وهناك بعض الإستثناءات لهذه القاعدة مثلا كان معدل تكوين النباتات الأحادية من متك نباتات *Brassica rapa* أعلى عند استعمال حبوب لقاح من نباتات تبدو مريضة. وكذلك كانت النباتات المنزرعة فى ميعاد متأخر جداً بهدف خفض فترة النمو الخضرى أقل من تلك التى زرعت قبلها بشهرين. ويزيد تعريض النباتات للإجهاد كنقص العناصر المغذية، والعطش، والبرودة أو بمعاملة النبات بالمواد التى تؤثر فى التطور الطبيعى لحبوب اللقاح كالأوكسينات والإثيريل ومضادات الجبريللين من إنتاج النباتات الإحادية. وإذا كان هناك حاجة لإستمرار الحصول على المتك طول موسم النمو يمنع تكوين الثمار بإزالة الأزهار.

ب. **مرحلة تطور حبوب اللقاح:** تعتبر المرحلة التطورية التى يتم فيها جمع حبوب اللقاح من العوامل الحاسمة ليس فقط فى نجاح هذه العملية بل فى تكشف نباتات ثنائية. ويفضل أن تكون حول مرحلة الإنقسام الميتوزى الأول، بمعنى قبله مباشرة أو أثناءه أو عقب خروج الخلية منه، مع وجود بعض الإختلافات بين الأنواع النباتية. ويمكن بالخبرة استعمال حجم البرعم الزهرى كمؤشر على مرحلة تطور حبوب اللقاح، لكن بالطبع يتأثر حجم البرعم بالعديد من ظروف النمو. ومن ثم ينصح بزراعة النباتات المستخدمة كمصدر للمُستأصَلات النباتية تحت ظروف حرارة وضوء محددة لتحديد الطور المناسب للبرعم الزهرى.

ج. **جدار المتك:** لجدار المتك أهمية فى تطور الأجنة من حبوب اللقاح ويتضح ذلك من رفع نسبة الأجنة المتكونة بزراعة حبوب اللقاح مع مزرعة حاضنة عبارة عن كالس جدار المتك. أو بفصل حبوب اللقاح بعد زراعة المتك لمدة أسبوع فى بيئة إنتاج النباتات الأحادية.

د. **المعاملة الأولية:** تستخدم بعض المعاملات قبل زراعة المتك أو حبوب اللقاح لإستحثاث تكوين الأجنة الأحادية، لكن ليس من الضرورى اللجوء لتلك المعاملات فى بعض الأنواع. وعموماً تشجع العديد من العوامل كالضغط الأسموزى، والحرارة المنخفضة، والإشعاع، ونقص بعض العناصر المغذية وغيرها التى تعتبر بمثابة اجهاد بيئى من تكوين النباتات الأحادية (Maraschin *et al.*, 2005). وتوضح الدراسة السابقة أن تكوين النباتات الأحادية والأجنة الجسدية يمر بثلاثة مراحل هى امتلاك القدرة على تكشف الأجنة الجسدية، ثم بدء الانقسام الخلوى وأخيراً نظام توزيع الخلايا المنقسمة. وتعمل عوامل الإجهاد التى سبق الإشارة إليها وكذلك منظمات النمو على اعادة برمجة عمليات الأيض فى الخلية ومنها تثبيط تعبير الجينات المنوط بها التخليق الحيوى للنشا وتنشيط عدد أخر من الجينات المنظمة لتكوين الأجنة الجسدية والتى تسمى BABY BOOM Transcription factor.

وبعد بدء انقسام الخلايا لتكوين الأجنة وتوزيع الخلايا بشكل يضمن تكون الأجنة يلاحظ نشاط الجينات التى تلعب دور فى موت الخلية. وتؤثر المعاملات الأولية للمتك قبل الزراعة على نشاط هذه العوامل فعلى سبيل المثال الصدمة الحرارية بتعريض المتك أو حبوب اللقاح لدرجة حرارة منخفضة ٤ : ٥° م لفترة تختلف باختلاف النوع النباتى ومرحلة تطور حبوب اللقاح، ثم الزراعة على درجة ٢٥° م. وقد رفعت هذه المعاملة لمدة ٧٢ ساعة نسبة متوك *Nicotiana*

tabacum التى أعطت أجنة أحادية من ٢١% إلى ٥٨% . وفى بعض النباتات مثل *Capsicum* وبعض الطرز الوراثية من القمح والشوفان كانت المعاملة الأولية بدرجة حرارة ٣٠-٣٥°م لفترة ١-٤ يوم مفيدة فى تحفيز تكوين الأجنة الأحادية. وقد أرجع Pechan *et al.* (1991) ذلك إلى تكوين بعض البروتينات ذات الوزن الجزيئى العالى المنشطة لتكشف الأجنة الأحادية أثناء الصدمة الحرارية. وبتعريض متك الدخان والداتورا والقمح قبل الزراعة لأشعة جاما بجرعات منخفضة (1-5 Gys) زاد معدل تكوين النباتات الأحادية وكذلك النباتات الخضراء والنباتات الأحادية المتضاعفة بمعدل كبير خاصة فى القمح (Ling *et al.,* 1991). والأكثر من ذلك أنها شجعت تكوين الأجنة الأحادية فى البراعم المسنة التى تعدت المرحلة المناسبة للزراعة، وفى طرز لا تستجيب لهذه الظاهرة. ومن المعروف أن هذه الأشعة تعمل على تثبيط النواة والتأثير على محتوى الأنسجة من الأوكسينات والسيتوكينينات. وقد يكون لبعض منظمات النمو كحمض ABA المضافة للبيئة تأثير إيجابى على تكوين النباتات الأحادية عبر تأثيرها كعوامل مرتبطة بالإجهاد.

هـ. **بيئة الزراعة:** هناك اختلاف كبير فى مكونات البيئة الصالحة لزراعة المتك بالمقارنة مع زراعة الأعضاء النباتية الأخرى. فعلى العكس من التطور الطبيعى بانقسام الخلايا الجرثومية microspore مرتين فقط فإن تطور الأجنة من حبوب اللقاح يستلزم العديد من الانقسامات لتصبح حبة اللقاح عديدة الخلايا. ويمكن أن يتم ذلك فى الحقل برش النباتات بمركب 2-chloroethylphosphonic acid وبإضافة هذا المركب لبيئة زراعة متك الدخان زاد معدل إنتاج النباتات الأحادية. ويمكن تشجيع انقسام حبة اللقاح بزراعة متك الدخان على بيئة من السكر والآجار فقط مما يشير إلى دور السكر والذى قد يتراوح بين ٢-٦%. لكن لا بد من رفع هذه النسبة حتى ١٢-١٣% لأجناس *Brassica* وربما يرجع ذلك لإبقاء حبوب

اللقاح حية فترة اطول. وفى القمح يتم استبدال السكر بالمالتوز (Last & Brettell, 1990) أما بالنسبة للمكونات المعدنية للبيئة فبها تباين كبير ومن الصعب التوصية ببيئة محددة، لكن يتباين هذا باختلاف حتى عمرالنبات الأم. ومع هذا يبين جدول رقم (٦-٢٣) بعض البيئات التى ثبت نجاحها فى بعض الأنواع.

و. **كثافة الزراعة**: كما هو الحال فى المزارع الخلوية تمثل كثافة الزراعة عاملاً أساسياً فى مزارع حبوب اللقاح ففى *B. napus* كانت الكثافة المثلى ١٠٠٠٠-٤٠٠٠٠ حبة لقاح/مل من البيئة والحد الأدنى لتحقيق النمو ٣٠٠٠ حبة لقاح. ويشير Arnison *et al.* (1990) أن تخفيف الكثافة إلى ١٠٠٠ حبة لقاح/مل بعد يومين من الزراعة لم تؤثر فى عدد النباتات الناتجة. وفى *B. oleracea* زاد عدد النباتات الأحادية عند زراعة ١٢-٢٤ متك لكل ٤ مل من بيئة الزراعة مقابل ثلاثة فقط. لكن يبدو أن ذلك يرتبط بالطرز الوراثى حيث تتعارض هذه النتائج مع بعض الملاحظات فى *B. napus*.

ي. **الضوء**: لا يلعب الضوء دوراً هام فى إنتاج الأجنة الأحادية لبعض النباتات كالدخان والداتورا، لكن ربما يكون لحفظ مزارع حبوب اللقاح فى بعض المراحل فى الظلام ثم نقلها للضوء فائدة.

كيفية زراعة المتك معملياً

هناك طريقتين أساسيتين للحصول على النسيج المناسب للحصول على نباتات أحادية من زراعة المتك وهما:

أ. عزل الأزهار قبل التفتح وتعقيمها سطحيا ثم فصل المتك وزراعته فى بيئة شبه صلبة أو سائلة. وقد يتم الحصول على المتك من الأزهار المتفتحة وتعقيمه. ويجب

عدم إحداث ضرر للمتك، وربما يفصل الخيط مع المتك لكن قد يسبب وجود ولو جزء بسيط منه تقليل معدل التكشف في بعض النباتات.

جدول ٦-٢٣: مكونات بعض البيئات الأساسية الشائعة الاستعمال في زراعة مزارع المتك وحبوب اللقاح (Bhojwani & Razdan, 1996).

المكون	البيئة (التركيز ملجم/لتر)					
	NN[1]	N_6[2]	Potato[3]	Nitsch[4]	KA[5]	NLN[6]
				المركبات المعدنية		
NH_4NO_3	٧٢٥	-	-	٧٢٥	-	-
KNO_3	٩٥٠	٢٨٣٠	١٠٠٠	٩٥٠	٢٥٠٠	١٢٥
$CaCl_2.2H_2O$	١٦٦	١٦٦	-	١٦٦	٧٥٠	-
$MgSo_4.7H_2O$	١٨٥	١٨٥	١٢٥	١٨٥	٢٥٠	١٢٥
KH_2PO_4	٦٨	٤٠٠	٢٠٠	٦٨	-	١٢٥
$(NH_4)_2SO_4$	-	٤٦٣	١٠٠	٦٨	-	١٢٥
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	-	-	١٠٠	-	-	٥٠٠
$NaH_2PO_2.2H_2O$	-	-	-	-	١٥٠	-
KCl	-	-	٣٥	-	-	-
KI	-	٠.٨	-	-	٠.٧٥	-
H_3BO_3	١٠	١.٦	-	-	٣	١٠
$MnSo_4.4H_2O$	٢٥	٤.٤	-	-	-	٢٥
$MnSo_4.H_2O$	-	-	-	-	١٠	-
$ZnSO_4.7H_2O$	١٠	١.٥	-	-	٢	١٠
$ZnSO_4.4H_2O$	-	-	-	-		-
$Na_2MoO_4.2H_2O$	٠.٢٥	-	-	-	٠.٢٥	٠.٢٥
MoO_3	٠.٠٠١	-	-	-	-	-

تابع جدول ٦-٢٣

$CuSO_4.5H_2O$	٠.٠٢٥	-	-	-	٠.٠٢٥	٠.٠٢٥
$CoCl_2.6H_2O$	-	-	-	-	٠.٠٢٥	٠.٠٢٥
$CoSO_4.7H_2O$	-	-	-	-	-	-
$FeSO_4.7H_2O$	٢٧.٨	٢٧.٨	-	٢٧.٨	-	٢.٧٨
$Na_2.EDTA$	٣٧.٣-	٣٧.٣	-	٧.٣.	-	٢٧.٣
Sequestrene 330Fe	-	-	-	-	٤٠	-
			المركبات العضوية			
Inositol	١٠٠	-	-	٤.٥٠٢	١٠٠	١٠٠
Pyridoxine-HCl	٠.٥	٠.٥	-	-	١	٠.٥
Thiamine-HCl	٠.٥	١	١	-	١٠	٠.٥
Nicotinic acid	٥	٠.٥	-	-	١	٠.٥
Glycine	-	٢	٢	-	-	٢
L-Glutamine	-	-	-	٧٣٠	٨٠٠	٨٠٠
L-Serine	-	-	-	١٠٥	١٠٠	١٠٠
Folic Acid	٥	-	-	-	-	٠.٥
Biotin	٠.٥	-	-	-	-	٠.٥
NAA	-	-	-	-	٠.١	٠.٥
2,4-D	-	٢	١٥	-	-	-
BAP	-	-	-	-	-	٠.٠٥
Kinetin	-	٠.٥	٠.٥	-	-	-
Potato extract*	-	-	-	١٠ جم	-	-
Agar%	٠.٨	٠.٨	٠.٦	-	٠.٨	-
Sucrose%	٢	٢-١٥	٩-١٠	٢	١٠	١٣

[1] Nitsch & Nitsch (1969). [2] Chu (1978). [3]Chuang et al. (1977). [5] Keller and Armstrong (1977). [6]Polsoni et al. (1988). * 100 g sliced potato tuber boiled in distilled water for 25-30 min and then strained and filtered.

ب. فصل النورة الزهرية وتنميتها فى بيئة سائلة بسيطة التركيب لا تشجع التكشف من الأنسجة الثنائية التركيب، وهى طريقة شائعة الاستعمال فى العائلة النجيلية والنباتات ذات الأزهار الصغيرة مثل Asparagus و Brassica و Trifolium لكن يقتصر استعمال هذه الطريقة على الطرز الوراثية المعروفة بقدرتها على تكوين نباتات أحادية. وبعد الزراعة بـ ٣-٨ أسابيع يلاحظ تغير لون المتك الذى استجاب إلى اللون البنى ثم ينفجر بسبب الضغط الداخلى الناتج من نمو الأجنة أو كالس حبوب اللقاح. وقد تنبت الأجنة فى نفس البيئة أو يلزم نقلها إلى وسط جديد للإنبات والتطور. ويجب التنويه إلى أن النباتات الناتجة من متوك مختلفة أو حتى من نفس المتك متباينة وراثياً لذا يتم تضاعف كل نبات بالعقل الساقية على انفراد ليكون عشيرة.

لكن هناك العديد من العيوب حول استعمال مزارع المتك لخصها (Bohajawni & Razdan, 1996) فيما يلى:

أ. إمكانية إنتاج نباتات ثنائية فقد تنشط الخلايا المكونة لجدار المتك وهو ثنائى التركيب فى التكشف أثناء تكوين النباتات الأحادية. وحتى الآن يصعب التحكم فى توجيه الخلايا الأحادية فقط للانقسام دون الثنائية.

ب. التخلص من الأنسجة التى تسهل انتقال المواد المغذية وباقى مكونات البيئة لحبوب اللقاح.

ج. التخلص من المواد السامة والمثبطة الموجودة بالجنين كحامض الأبسيسك فى نباتات *Brassica napus* كما أشار Kott *et al.* (1988). وعلاوة على ذلك ربما تثبيط حبوب اللقاح الأكبر عمراً تكون النباتات الأحادية من الحبوب الأصغر.

د. فرصة تكوين الكيميرا بسبب اختلاط الكالس من أكثر من حبة لقاح.

هـ. صعوبة متابعة تطور الجنين.

وللتغلب على العيوب السابقة ابتكر(1970) Kameya & Hinata تقنية زراعة حبوب لقاح نبات *Brassica oleracea* بدون أنسجة المتك. ومن السهل تحديد الطور المناسب من مراحل تطور حبوب اللقاح وفصلها وزراعتها فى المرحلة المناسبة لتكوين النباتات الأحادية. ولكنها طريقة صعبة فى التطبيق وتحتاج إلى بيئة أكثر تعقيداً، ويتكشف منها عدد قليل من النباتات. ويزيد معدل نجاح زراعة حبوب اللقاح باستعمال مزرعة حاضنة قد تكون بببساطة هى المتك نفسه مع وضع ورقة ترشيح لتفصل بين الاثنين. ويعتبر إضافة الأحماض الأمينية glutamine و l-serine و myo-inositol مهماً فى مزارع المتك عموماً وحبوب اللقاح خاصاً.

لكن على الرغم من صعوبة مزارع حبوب اللقاح فإن عدد نباتات *B. napus* الأحادية المتكشف بهذه الطريقة كان ٦٠ ضعف العدد الناتج بالطريقة الأولى Aslam *et al.* (1990). ويفضل فى النجيليات زراعة المتك كاملاً لمدة ٢ :٧ يوم قبل فصل وزراعة حبوب اللقاح حيث يمثل وجود أنسجة جدار المتك حافزاً لتكوين الأجنة من الحبوب التى تفصل أما بطريقة ميكانيكية أو بالمعاملة بالبرودة فى وسط سائل لتطفو فيه ثم تزرع. ولرفع معدل إنتاج النباتات الأحادية بزراعة حبوب اللقاح فصل Wenzel *et al.* (1975) حبوب لقاح الشعير التى تميل إلى androgensis عن تلك الغير مؤهلة لهذه العملية وذلك بجمع حبوب اللقاح بعد تمزيق المتك وإزالة الأنسجة من المعلق بالتصفية عدة مرات. يلى ذلك الطرد المركزى لمدة خمسة دقائق على سرعة 1200g فى محلول ٣٠% سكر، ثم جمع حبوب اللقاح الموجودة فى أعلى المحلول. ويلاحظ وجود فجوات تشير إلى مقدرتها على تكوين أجنة أحادية. وقد طورت هذه الطريقة بعد ذلك باستعمال ٥٥% من مادة Percoll مع ٤% سكر. وقد تكون الزيادة الكبيرة فى تكوين الأجنة الأحادية فى هذه الحالة راجعة لعملية الطرد المركزى فى حد ذاتها حيث أعطت نتائج إيجابية فى العديد من النباتات. وقد أمكن إنتاج نباتات أحادية باستخدام حبوب اللقاح فى عدد من النباتات منها *Petunia*

hybrid و *Lycopersicon lycopersicum* و*Datura innoxia* كما بينها Chawla (2000) و Razdan (2002).

١. استعمال الجاميطات المؤنثة

يمكن إنتاج النباتات الأحادية بطرق أخرى غير زراعة المتك أو استعمال لحبوب اللقاح فى العديد من النباتات مثل الشعير وبنجر السكر ودوار الشمس وغيرها. وذلك من خلايا غير مخصبة من الكيس الجنينى أو المبيض أو البويضات نفسها. وتعتبر هذه الطريقة البديل المناسبة للنبات التى تمتاز بالعقم الذكرى. واشهر هذه الطرق parthenogenesis حيث تتطور خلية البويضة غير المخصبة كنتيجة لتأخير التلقيح، أو بالتلقيح الكاذب عبر استخدام حبة لقاح بها خلل كنتيجة للمعاملة بالأشعة المؤينة كما فى نباتات *Cucumis melo*، وأحياناً باستعمال حبة لقاح غريبة قد تكون من نفس النوع لكنها لا تحدث الإخصاب. وقد لوحظت هذه الظاهرة فى الهجن النوعية مثل *Solanum tuberosum* و *Solanumphureja* حيث ينتج نبات dihaploid (2n=2x) والذى يفترض أن يكون رباعى tetraploid (2n=4x) ولكن لكى نضمن حيوية الجنين وعدم حدوث إجهاض لا بد من تكوين الإندوسبرم. وقد تتكشف الأجنة الأحادية بطريقة مباشرة من المُستأصَلات النباتية أو بعد تكوين الكالس.

وبالمقارنة مع زراعة المتك فإن الأبحاث المتاحة عن طريقة gynogensis قليلة نسبياً، وذلك لصعوبة تطبيقها على الكثير من النباتات. ومن الناحية التطبيقية تستعمل هذه الطريقة مع النباتات التى لا يحقق فيها زراعة المتك نجاح مناسب كبنجر السكر والبصل. لكن يلاحظ انخفاض عدد النباتات الالبينو لنباتات العائلة النجيلية الناتجة بهذه الطريقة. ويلاحظ أن استجابة البويضات يكون أفضل إذا كانت متصلة بالمشيمة. لكن من استعراض Bohajawni & Razdan (1996) يتضح التباين الشديد بين المُستأصَلات المختلفة على أساس النوع النباتى. وكما هو الحال فى زراعة المتك كان لمعاملات

البرودة الأولية تأثير إيجابى فى تحفيز إنتاج النباتات الأحادية لنباتات دوار الشمس والأرز. أما بيئة الزراعة فقد تباينت بين الأبحاث المتاحة وأكثرها استعمالاً هو MS و N6 مع اضافة السكر بتركيز يتراوح بين ٣-١٤% (لنباتات القمح والشعير)، وفى العادة تستعمل البيئة شبه الصلبة إلا أن استعمال المزارع السائلة فى بدء تكوين المزرعة الأولية لنباتات الأرز كان ناجحاً.

وهناك طريقة أخرى للحصول على النباتات الأحادية وهى طريقة تستعمل فى بعض الهجن، فمثلاً عند تهجين *Hordeum vulgare* مع *H. bulbosum* يحدث استبعاد لكروموسومات الأخير عقب الإخصاب ويتكون جنين أحادى من الأول لكن بدون اندوسبرم.ويموت هذا الجنين سريعاً إذا لم يفصل ويزرع فى المعمل فيما يعرف بمزارع الأجنة. وعموما ما زالت هناك بعض المشاكل غير تلك التى تم الإشارة إليها تعيق إنتاج النباتات الأحادية باستعمال زراعة الأنسجة ومنها تكشف نباتات ثنائية ورباعية فى ذات الوقت مع تكشف النباتات الأحادية. وصعوبة استعمال حبوب اللقاح لحل هذه المشكلة مع كثير من النباتات.

لعل السمات المميزة للنباتات الأحادية هى قصرها وصغر حجم الأوراق خاصة النصل، وزيادة الثمار الصغيرة بسبب عدم تكوين البذور لأن حجم الثمار يرتبط غالباً بحجم وعدد البذور. وربما يشاهد عدد من الأوراق والأزهار الغير كاملة التكوين، أو اندماج أكثر من ورقة أو زهرة مع بعضهما البعض على العكس من النباتات الثنائية التى تنمو تحت نفس الظروف. وهناك طريقتين اساسيتين للحصول على نباتات ثنائية من تلك الأحادية. وقد اقترح Jensen (1974, 1986) الطريقة الأولى بغمر نباتات الشعير عندما كان عدد أوراقها خمسة أوراق بمحلول٠.١% من كلوشيسين ويستعمل مركب DMSO بتركيز ٢% و ٠.٠٥-٠.٢ مل من Tween لإذابة الكلوشيسين. وتستمر المعاملة لمدة خمس ساعات فى الضوء وعلى درجة حرارة ٢٠ – ٢٢°م. أما النباتات ذات الفلقتين

الأحادية فيقترح اضافة تركيز ٠.٠٥% من الكلوشيسين إلى القمم النامية مباشرة للنباتات الصغيرة باستعمال محقن دقيق (١٠ ميكروليتر). وفى الدخان يمكن أن تنتج النباتات الثنائية تلقائيا عند زراعة البراعم الورقية للنباتات الأحادية فى المعمل وبإكثار النباتات الناتجة خضريا يمكن المحافظة على التركيب الوراثى الأصيل للنباتات. لكن تزهر نباتات الدخان الأحادية مبكرا عن تلك التى تم تضاعفها، ويعتقد أنها تحتوى على تركيز أقل من حامض الجبرليلك حيث أن معاملتها بالجبريللين أعطى نتائج مشابهه للنباتات المتضاعفة.

ثامناً: التلقيح والإخصاب فى أنابيب الاختبار

تتكاثر النباتات الزهرية جنسيا بالبذور والتى تتكون كنهاية طبيعية للعديد من العمليات الحيوية ضمن ما يعرف بالتلقيح والإخصاب المزدوج، ويسبق ذلك مجموعة من العمليات المعقدة لتكوين أعضاء التذكير والتأنيث. وفى الحالات الطبيعية تنمو حبة اللقاح بمجرد ملامسة الميسم المعد لاستقبالها مكونة الانبوبة اللقاحية التى تمر خلال نسيج الميسم والقلم والمبيض وتصل فى النهاية إلى الكيس الجنينى حيث يتم الاندماج الثنائى بين أحد الانوية المذكرة والخلية الأمية وبذلك يتكون الجنين الزيجوتى ذو التركيب الثنائى المجموعة الكروموسومية. وتتحد النواة الاسبرمية الثانية مع النواتين القطبيتين المتواجدتين فى وسط الكيس الجنينى لتكوين الاندوسبرم وبهذا يكون الاندوسبرم ثلاثى المجموعة الكروموسومية. ويعتبر النسيج الاندوسبرمى ذو أهمية كبيرة فى إمداد الجنين بما يحتاجه من مغذيات، ويسبب عدم ملائمة الاندوسبرم لتغذية الجنين وإجهاضه.

وتتم هذه السلسلة من العمليات البيولوجية بنجاح عندما يكون هناك توافق بين حبوب اللقاح وبين الميسم. وعلى النقيض من ذلك عندما يتم التلقيح فى النباتات التى تتميز بوجود ظاهرة عدم التوافق الذاتى أو بين الأنواع والأجناس غير المتوافقة يثبط نمو الأنبوبة اللقاحية أو تحدث إعاقة فسيولوجية تمنع حدوث الإخصاب بين الخلايا الاسبرمية

وبين خلايا الكيس الجنينى. يحدث هذا أيضاً فى بعض حالات التهجين المتباعد حيث توجد جينات تسبب عدم التوافق بين نمو أنسجة الأم والجنين وتطور نسيج الاندوسبرم وبهذا يحدث إجهاض للجنين الزيجوتى ولا تتكون البذرة.

• ونظراً لحدوث الاخصاب المزدوج داخل الكيس الجنينى الموجود داخل عديد من الأنسجة الجسدية فإن آلية هذا الإخصاب ظلت غيرمعروفة لوقت طويل. وقد أمكن من خلال التقدم فى علم زراعة الأنسجة إجراء عمليات التلقيح والإخصاب باستخدام أعضاء نباتية منزرعة على بيئة غذائية للتغلب على عقبات نمو الأنبوبة اللقاحية وإخصاب البويضات طبيعياً. وقد ساعد ذلك خاصة بعد الحصول على طفرات ذات دور فى عمليتى التلقيح والاخصاب لنبات الأرابدوبسس فى فهم آلية حدوث الإخصاب المزدوج على المستوى الجزئى (Faure, 2001). بالإضافة إلى ذلك فإن التلقيح المعملى يعتبر طريقة فعالة فى الحصول على الأجنة الهجين والتى يصعب الحصول عليها بالطرق التقليدية وقد أورد (Razdan, 2002) العشرات من المحاولات التى تمت للحصول على هجن بين أجناس مختلفة ومنها بعض الأمثلة الناجحة للحصول على أجنة هجين. وقد مر تطور التلقيح والإخصاب فى مزارع الأنسجة بعدة مراحل كما أوردها Pierik , (1987) و Faure (2001) وهى:

١. حاول Boiso فى الأربعينيات من القرن الماضى تحقيق هذا الهدف بإزالة القلم من الزهرة ثم وضع حبوب اللقاح على الجزء العلوى من المبيض لكنه لم يتمكن من الحصول على جنين.
٢. وفى فترة لاحقة أمكن الحصول على بذور ناضجة بحقن مبيض بعض الأزهار بمعلق خلوى يحوى حبوب اللقاح بعد إزالة أعضاء التذكير أو قبل تفتح المتك وانتشار حبوب اللقاح حيث أمكن التغلب على ظاهرة عدم التوافق والتى تعيق عمليات الإخصاب فى بعض نباتات العائلة الصليبية. ونظراً لصعوبة اختراق

الخلايا الاسبرمية للكيس الجنينى أحيانا تم تطوير هذه الطريقة بحقن الخلايا الاسبرمية فى الكيس الجنينى مباشرة.

٣. فى أوائل التسعينات تقدم أسلوب الإخصاب فى أنبوبة الاختبار وأمكن فصل البويضة بمفردها من الكيس الجنينى أو فصلها ملتحمة مع الخلايا المساعدة. وأمكن أيضاً فصل الخلايا الاسبرمية من حبوب اللقاح وبزراعة هذه التراكيب الخلوية معاً فى أنبوبة اختبار وباستخدام بيئة تحتوى على ١-١٠ مليمول من كلوريد الكالسيوم ورقم هيدروجينى منخفض للعمل على التصاق الجاميطات معاً، وبهذا نجحت أول تجربة لإخصاب الخلايا الجنسية المنفصلة. وبخفض تركيز كلوريد الكالسيوم إلى ١٠٠ ميكرومول تفادى Antoine *et al.* (2000) حدوث اندماج أكثر من أسبرم مع خلية البويضة.

٤. وفى نفس العقد تمكن Kranz *et al.* (1991) من استخدام التيار الكهربائى لدمج الجاميطات المذكرة والمؤنثة لنباتات الذرة، وأعقب ذلك الحصول على نبات ذرة خصب. وتطورت هذه الطريقة بعد ذلك لتشمل عديد من الأنواع. ويستهل ناتج الإندماج الكهربائى أو الكميائى تكون جدار خلوى خلال دقائق بسيطة من الإندماج لمنع إندماج اسبرمى آخر لتكوين ما يعرف بـ polyspermy.

ويوجد العديد من الطرق التى يتم بها إجراء التلقيح والإخصاب وذلك حسب الهدف وهذه الطرق كما ذكرها Razdan (2002) هى:

١. زراعة البويضات المحمولة على المشيمة فى بيئة غذائية ثم إجراء تلقيح مباشر باستخدام حبوب اللقاح عندما تصل الأعضاء المؤنثة إلى مرحلة استقبال حبوب اللقاح وهو ما يعرف بـ*in vitro* placental pollination وذلك للتغلب على عدم التوافق فى *Petunia* أو لإنتاج نباتات *Mimulus luteus* أحادية عقب التلقيح بحبوب لقاح من نباتات *Torenia fournieri*. وقد نجح Petolino*et al.* (1990) فى الحصول على نباتات ذرة مقاومة للحرارة المرتفعة باستخدام هذه الطريقة

على درجة حرارة ٣٨° م بمعنى أن حبوب اللقاح المقاومة للحرارة المرتفعة فقد تمكنت من الإنبات والإخصاب وكانت النباتات الناتجة تحمل هذه الصفة. ونجح استخدام هذه الطريقة فى بعض النباتات الذاتية والخلطية التلقيح، لكن تحتاج هذه الطريقة إلى مهارة عالية وخبرة واسعة للحصول على نتائج جيدة.

٢. زراعة المبيض كاملاً بعد إزالة القلم ويتم التلقيح داخل المبيض باستخدام إبرة دقيقة. وكلما زاد عدد البويضات فى المبيض ارتفع معدل نجاح هذه الطريقة، حيث يتيح العدد الكبير الفرصة فى وجود عدد من البويضات التى لم تصاب أثناء عزل المبيض. كما يجب أن تتمتع حبوب اللقاح بحيوية عالية وقدرة على الإنبات. وربما تعامل المبايض بمحلول كلوريد الكالسيوم تركيزه ١% قبل يوم من التلقيح لتشجيع نمو أنبوب اللقاح (Zenkteler, 1970).

٣. إذا كان الهدف هو متابعة عملية الإخصاب وتطور الجنين فى أنبوبة الاختبار فيجرى فصل وزراعة البويضات فى بيئة سائلة قبل الإخصاب الطبيعى ثم التلقيح بحبوب اللقاح. ويعيق وجود غشاء مائى حول البويضة نمو انبوبة اللقاح، ويمكن التخلص منه باستعمال ورق ترشيح وعند نجاح التلقيح يشاهد نمو الأنبوبة اللقاحية فى مراحل مبكرة ويتم الإخصاب بين الجاميطات المذكرة والمؤنثة. لكن يصعب متابعة مراحل التطور المبكرة نظراً لصغر حجم حبوب اللقاح وكذلك وجود طبقات عديدة من الأنسجة التى تحيط بالكيس الجنينى فيلزم إعداد عينات فى مراحل التطور المختلفة للفحص الميكروسكوبى.

٤. ابتكر Nitsch (1951) فى بداية الخمسينيات طريقة تعتمد على فصل المبيض من أزهار Cucums و Lycopersicom عقب التلقيح وزراعتها فى بيئة مغذية بغرض الحصول على بذور لكنها كانت أصغر حجماً من تلك الطبيعية. وكان لإضافة فيتامين ب و لبن جوز الهند وهرمون IAA تأثير واضح على حجم الثمار

والبذور المتكونة فى القوارير. وفى بعض النباتات أحادية الفلقة يعتبر وجود الغلاف الزهرى من العوامل الضرورية لنمو الجنين والثمار.

٥. تمكن (1993) Kranz & Lorz من عزل الجاميطات المذكرة عقب إنبات حبوب اللقاح باستعمال الجهد الأسموزى، وكذلك الجاميطات المؤنثة من داخل الكيس الجنينى والتى تحتوى على خلية البويضة والنواتان المساعدتان ويتم ذلك باستعمال بعض الإنزيمات التى تحلل الجدار الخلوى أو بطريقة ميكانيكية. وتحت المجهر أمكن دمج الجاميطة المذكرة بالمؤنثة بطريقة كهربائية أو باستعمال بعض الكيماويات مثل PEG وبالفعل تكون الزيجوت وانقسم وتكون نبات ذرة خصب. لكن هذه الطريقة معقدة وتحتاج لدقة عالية جداً (Bohajawni & Razdan, 1996).

حاول العلماء فهم المتطلبات المختلفة والظروف المحيطة والتى تناسب عمليات الإخصاب وتكوين الجنين والبذور فى أنابيب الاختبار. وركزت هذه الدراسات على المحاصيل الاقتصادية كالذرة والقمح. اشتملت هذه الأبحاث على دراسة التركيب الوراثى وحيوية ونوعية حبوب اللقاح وكذلك المراحل التطورية المختلفة للأعضاء المؤنثة وتحديد أفضل الظروف التى تتوافق مع حدوث نجاح التلقيح والإخصاب داخل أنبوبة الاختبار. ويعتبر تركيب البيئة المناسب للمبايض صغيرة العمر من العقبات التى تعيق استخدام هذه الطريقة.

وبالرغم مما حققته هذه الطريقة من نجاح إلا أن هناك بعض العقبات التى تعيق تطور الجنين فى أنبوبة الاختبار عقب نجاح التلقيح والإخصاب فقد يحدث انقسام ميتوزى للزيجوت وينتج جنين مكوناً من العديد من الخلايا ولكن بعدها يفقد الجنين القدرة على الانقسام والتطور،ويمثل ذلك مشكلة كبيرة حيث يصعب الحصول على النبات الهجين. كذلك فإن هناك بعض المشاكل التى ترتبط بانفجار الأنبوبة اللقاحية وفقد الحيوية أو

انحلال البيضة وعدم تطور الاندوسبرم. وبصورة عامة بعد حدوث التلقيح فى أنبوبة الاختبار يلاحظ زيادة واضحة فى حجم المبيض. وقد يكون السبب المباشر فى انتفاخ المبيض هو زيادة حجم الاندوسبرم وليس الجنين، ففى بعض الحالات يفشل انقسام الجنين ولكن يستمر الاندوسبرم فى الانقسام والزيادة فى الحجم ويحدث ذلك فى التلقيح والإخصاب بين الأنواع النباتية المتباعدة وراثياً. يدل هذا على أن حدوث الإخصاب ليس أمراً أساسياً فى تطور الاندوسبرم فقد يحدث استحثاث لتكوين الاندوسبرم نتيجة لدخول أنبوبة اللقاح إلى الكيس الجنينى. لذا لابد من التأكد من نجاح التلقيح والإخصاب حيث يجرى فصل بعض البويضات عقب إجراء التلقيح بفترات متتالية ثم تفحص ميكروسكوبيا وبالتالى يمكن دراسة مراحل تطور الاندوسبرم والجنين (Pierik, 1987) و (Razdan, 2002).

يتم حفظ الأعضاء المؤنثة بعد التلقيح على حرارة ٢٥: ٢٧°م وذلك لتنشيط نمو الجنين بعد الإخصاب. ولا تحتاج المراحل المبكرة لنمو الجنين إلى مدى محدد من الضوء والحرارة حيث أن الجنين يمكن أن ينمو متصلا بالمشيمة على حرارة الغرفة. أما فى المراحل المتقدمة من نمو الجنين فيجب توفير الحرارة المناسبة والملائمة لاستمرار نمو الجنين. وليس هناك فرق فى استخدام هذه الطريقة لإجراء تلقيح ذاتى أو تلقيح خلطى لكن عند التلقيح الذاتى نجد أن الجنين يظل متصلا بالمشيمة إلى أن تصل البذرة إلى مرحلة النضج، أما فى حالة إجراء التلقيح الخلطى فيفضل فصل الجنين عن المشيمة بعد ١٠ أيام من إتمام التلقيح والإخصاب وعند توقف النمو ينقل الجنين إلى بيئة مغذية سائلة. وعندما يصبح الجنين أكثر نضجاً وتطوراً ينقل إلى بيئة صلبة. وفى بعض الحالات أمكن زراعة المبيض كاملاً بعد عملية التلقيح والإخصاب وبهذه الطريقة تطورت بعض ثمار الطماطم والخيار فى البيئة. وقد احتوت الثمار المتكونة على بذور، إلا أن حجم الثماركان صغيراً بالمقارنة بحجم الثمار التى تطورت تحت الظروف العادية. وأدى إضافة فيتامين ب إلى البيئة المغذية لتحسين حجم الثمار المتكونة وزيادة حيوية البذور الناتجة. أيضاً

اتضح أن إضافة بعض منظمات النمو النباتية مثل IAA أو مستخلص لبن جوز الهند يزيد من حجم الثمار.

تاسعاً: زراعة الأجنة

فى الجزء السابق تمت الإشارة إلى كيفية حدوث عمليتى التلقيح والإخصاب فى مزارع القوارير. أما زراعة الأجنة فتعنى عزل الجنين التام النضج أو غير تام النضج الناتج عقب التلقيح الطبيعى أو المعملى وزراعته على بيئة مغذية للحصول على نبات كامل. وكانت بداية هذه الوسيلة فى ١٩٠٤ بعزل الجنين الجنسى من نباتات Cochleria و Raphanus وزراعته على بيئة مغذية ليكون بادرة. ثم نجح Laibach فى عام ١٩٢٩ من انقاذ الجنين الناتج من تلقيح *Linum perenne* x *L. austrianum* بزراعته معملياً. وعموماً تهدف زراعة الأجنة معملياً إلى:

١. التغلب على مشاكل إجهاض الأجنة عقب الإخصاب.
٢. الحصول على نباتات كاملة تحت ظروف يتم التحكم فيها لدراسة مراحل تطور الجنين وتحويل الخلية الزيجوتية إلى جنين خلال العديد من العمليات المعقدة والتى تضم الانقسام الخلوى وتمدد الخلايا وفى النهاية تشكيل وتميز الأعضاء والتى تعتمد على التفاعل بين الخلايا المتكونة ونسيج الاندوسبرم.
٣. إنتاج هجن لا يمكن أو يصعب إنتاجها طبيعياً أو بالطرق التقليدية فى تربية النبات، أى أن زراعة الأجنة جزء هام ومكمل لعمليات التلقيح والإخصاب داخل أنابيب الاختبار.

وزراعة الأجنة خاصة غير تامة النضج عملية معقدة تتطلب مهارة عالية فى فصل الجنين من المبيض بدون حدوث ضرر لأنسجته وزراعته فى نوع مناسب من البيئات المغذية. ولمزيد من التفاصيل حول فصل أجنة نباتات مختلفة يرجع إلى (Pierik, 1987) و (Bohajawni & Razdan, 1996) و(Razdan, 2002) و (Reed, 2005). وعموما هناك طريقتان تستعملان لزراعة الأجنة هما:

زراعة الأجنة الناضجة

تمتاز زراعة الأجنة الناضجة بنسبة عالية من النجاح لعدم حاجة الجنين إلى بيئات غذائية معقدة. وقد أجريت أول تجربة لزراعة جنين على بيئة غذائية بواسطة Hanning فى بداية التسعينيات من القرن الماضى حيث فصل الجنين الناضج من بذور بعض نباتات العائلة الصليبية ثم زراعته على بيئة بسيطة محتويه على بعض الأملاح المعدنية والسكروز. وساعد استخدام البيئات الحالية معقدة التركيب والمضاف إليها السكروز إلى نمو بدايات الجذور والأفرع النباتية ومكنت هذه الطرق من دراسة احتياجات الأجنة وكذلك عمليات التمثيل الحيوى. وأصبح معروفاً أن الجنين المنفصل يمكنه النمو والاستفادة من النتروجين فى صورة أملاح النترات والأمونيوم والجلوتامين كمصدر للنتروجين. وبالطبع هناك تباين بين أجنة الأنواع النباتية المختلفة فى استجابتها لمنظمات النمو. ويعتبر نسيج الاندوسبرم مصدر لبعض الهرمونات التى تنشط نمو الجنين فجنين بذور القلقاس ينمو فى حالة وجود الاندوسبرم بما يحتويه من طبقة الأليرون. وقد تم زراعة ونمو بعض الأجنة المفصولة عن نسيج الاندوسبرم على بيئة مضاف إليها أوكسينات وسيتوكينينات ويدل هذا على أن الاندوسبرم يمد الجنين بالهرمونات اللازمة للنمو.

زراعة الأجنة غير الناضجة

فى كثير من الأنواع النباتية يدخل الجنين عقب وصوله طور النضج الكامل فى مرحلة السكون. وتتميز مرحلة السكون بانخفاض العمليات الحيوية وتستغرق هذه المرحلة من عدة أيام إلى عدة سنوات وذلك حسب النوع النباتى والظروف البيئية. ويمكن منع طور السكون الذى يحدث بتمام النضج بفصل الجنين غير الناضج وزراعته على بيئة مغذية حيث يستمر فى النمو ويطلق على ذلك النمو المبكر للجنين. وقد أمكن فى بداية التسعينات تثبيط النمو المبكر للجنين باستخدام حامض الابسيسك والذى يتكون خلال

مراحل التطور المختلفة. وفى بعض الأنواع يلاحظ إنبات الجنين والبذرة مازالت على النبات وترجع هذه الظاهرة إلى انخفاض تركيز حامض الأبسيسك فى البذرة أو عدم حساسية الجنين لوجود هذه المادة المثبطة للنمو. وقد اتضح أن الدور الذى يلعبه حامض الأبسيسك يرجع إلى عمله كمنظم لعمليات التمثيل الحيوى خلال تكون الجنين إذ يقوم بالتأثير على المحتوى المائى بالخلايا المكونة للجنين مما يقلل من نسبة الماء وبالتالى يدخل الجنين فى حالة السكون أما فى حالة انخفاض تركيزه ترتفع نسبة الماء وتحدث ظاهرة النمو المبكر.

كما يعتبر وجود أنسجة الأندوسبرم من العوامل التى تساعد فى نجاح زراعة الأجنة الغير ناضجة بشكل جيد بالمقارنة مع البيئات التقليدية. وينصح باستخدام اندوسبرم اكبر من عمر الجنين بحوالى خمسة أيام. وليس من الضرورى أن يكون الأندوسبرم من أحد الآباء وبهذه الطريقة تمكن Williams & De Lautour (1980) من زيادة عدد الأجنة الهجين التى أمكن الحصول عليها من تهجين عدة أجناس من الأعلاف البقولية بالمقارنة مع زراعتها فى بيئة مغذية. وتنقسم الاحتياجات الغذائية للأجنة غير المكتملة إلى مرحلتين الأولى خليطة الحاجة الغذائية heterotrophic حيث يحصل الجنين على احتياجاته من الأندوسبرم وأنسجة الأم. وبعد وصول الجنين إلى مرحلة متقدمة من النمو فإنه يصبح قادراً على تكوين احتياجاته الغذائية بنفسه لكن لا يزال الانتقال بين المرحلتين من المراحل الحرجة فى زراعة الأجنة. وعليه تختلف مكونات البيئة فى كلتا المرحلتين وربما يلزم نقل الجنين من بيئة إلى آخرى لإكتمال النمو. وقد ابتكر Ko *et al.* (1983) طريقة تمكن الجنين من النمو والتطور فى بيئة واحدة دون الحاجة إلى نقله لوسط جديد. وتطلب نمو جنين Datura إضافة لبن جوز الهند للبيئة وإلا تحول الجنين إلى كالس (Razdan, 2002). وغالبا يتم زراعة الأجنة على درجة حرارة ٢٥-٣٠° م وإن كان Reed (2005) يرى أن تتماثل درجة الحرارة مع تلك فى الظروف الطبيعية فالنباتات الشتوية تحتاج إلى درجة منخفضة. وربما يكون من الضرورى خفض درجات الحرارة

للنباتات المعروفة بطور السكون للأجنة. ومن التطبيقات العملية لزراعة الأجنة (Razdan, 2002) ما يلى:

١. التغلب على مثبطات النمو الموجودة بالبذور والتى تمنع الإنبات الطبيعى كما فى بذور العديد من النباتات مثل Rosa و Iris وبعض أنواع الصنوبر. وبذلك يمكن تقصير دورة التربية وإنتاج أكثر من جيل فى نفس العام، فمثلا أمكن تقصير دورة حياة نباتات الأيرس من ثلاث سنوات إلى أقل من سنة.
٢. إنبات بذور النباتات الجبرية التطفل كالهالوك.
٣. إنتاج النباتات الأحادية بعد التهجين بين أنواع مختلفة، فبعد تهجين *Hordeum vulgare* مع *H. bulbosum* يلاحظ حدوث استبعاد لكروموسومات *H. bulbosum* ويموت الزيجوت، لكن بفصل الجنين وزراعته يتم الحصول على نباتات أحادية من *Hordeum vulgare*.
٤. انتاج نباتات ثلاثية من تهجين آباء ثنائية مع رباعية.
٥. منع إجهاض الأجنة فى النباتات المبكرة النضج حيث يقف إمداد الجنين بالمواد الغذائية فى النباتات ذات النواة الحجرية كالخوخ، المشمش، البرقوق مبكرا عقب نضج الثمار وانفصالها من النبات الأم، مما يعنى موت الجنين والذى يمكن المحافظة عليه بفصله وزراعته معملياً.
٦. منع إجهاض الأجنة بسبب عدم التوافق.

عاشراً: عزل وزراعة البروتوبلاست

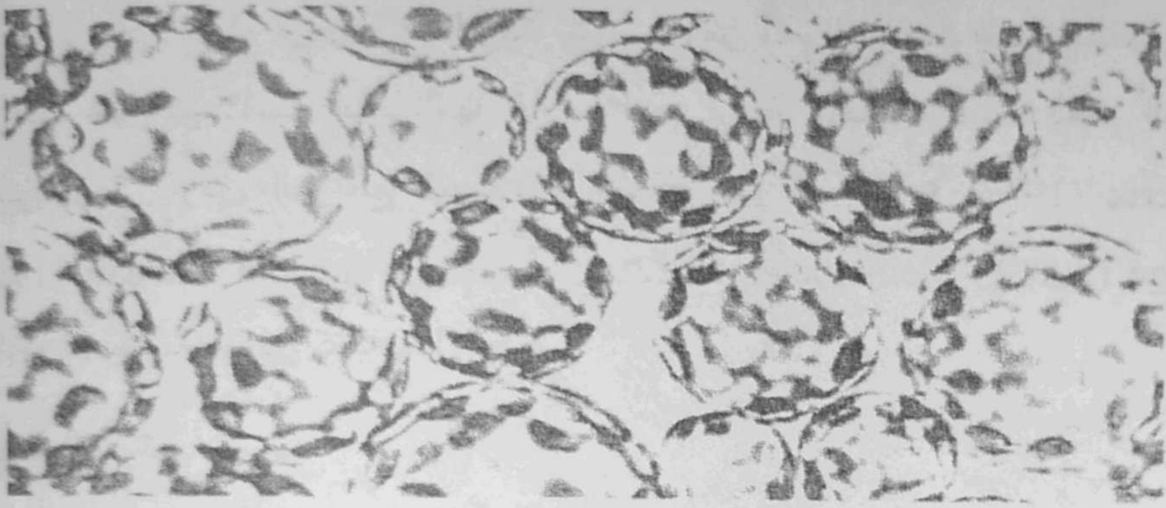
تتميز الخلية النباتية بوجود جدار سميك صلب يحيط بالخلية من الخارج يعرف بالجدار الخلوى. ويعتبر هذا الجدار العامل الأساسى فى تحديد شكل الخلية وتكوين الدعامة الأساسية للنبات، بالإضافة لكونه خط الحماية الأول ضد العوامل الخارجية، ودوره فى تكوين الأنسجة والاتصال بين الخلايا وبعضها البعض. وبالرغم من هذا الدور فإنه يعتبر من وجهة نظر علماء الأحياء عائقاً لإحداث دمج الخلايا للحصول على هجن جسدية. ومن ثم اتجهوا إلى محاولة إزالة هذا الجدار لإتمام عملية الدمج البروتوبلاستى. وكانت بداية هذا النجاح عندما استطاع Cocking (1960) فى استخلاص إنزيم

Cellulase من فطر *Myrothecium verrucaria*. حيث أمكن باستخدام هذا الإنزيم هدم السيلولوز المكون للجدار الخلوى وتحرير البروتوبلاست أى الخلية منزوعة الجدار الخلوى فى صورة حية من القمم النامية لجذور الطماطم. وبعد نجاح المحاولات الأولى فى عزل البروتوبلاست تم إحداث تطور للتقنية المستعملة لعزل البروتوبلاست وزراعته فى وسط مغذى للحصول على نباتات كاملة وكان لذلك دوراً هاماً فى التحسين النباتى للعديد من الأنواع النباتية. وتجدر الإشارة إلى أن Takebe *et al*. (1971) حصول على أول نبات دخان كامل من زراعة البروتوبلاست. ومن أهم التطبيقات العملية لتقنية عزل وزراعة البروتوبلاست استخدامها فى برامج تربية النباتات ذات العقم الذكرى السيتوبلازمى. ومن المراجع الجيدة التى تعالج هذا الموضوع Pierik (1987) و (Bhojwani and Razdan (1996) و(2005) Veilleux *et al.* و(2008) George التى تم الاستعانة بها فى كتابة هذا الجزء.

طبيعة البروتوبلاست

يعتبر البروتوبلاست خلية عارية منزوعة الجدار الخلوى كما فى الشكل رقم (٦-١٦) أى أنه عبارة عن سيتوبلازم محاط بغشاء خلوى فقط ذو شحنات سالبة ويسبب ذلك تنافر بين البروتوبلاست وبعضه البعض، وكذلك بينه وبين الجزئيات الأخرى التى تحمل نفس الشحنة والموجودة فى الوسط المحيط. ولو تم تحرير البروتوبلاست فى ماء أو وسط غذائى ذو ضغط اسموزى عادى فإن البروتوبلاست سوف ينفجر بسرعة لامتصاصه الماء ولعدم وجود الضغط الجدارى الذى يضاد الضغط الاسموزى للسيتوبلازم. ومن ثم يتبين ضرورة استعمال محلول ذو ضغط اسموزى مرتفع ومناسب أى ذو قيمة سالبة عالية أثناء فصل البروتوبلاست. وإذا كان الضغط الاسموزى لمحلول الفصل منخفض جدا يلاحظ بلزمة البروتوبلاست بخروج الماء إلى الوسط الخارجى ويسبب ذلك ضرر شديد للبروتوبلاست. وبمجرد إزالة الجدار الخلوى يتحرر

البروتوبلاست فى وسط الفصل المناسب من الناحية الاسموزية بشكل كروى. وتشاهد بروزات كروية على السطح الخارجى للغشاء البروتوبلاستى بسبب وجود فجوات فى الغشاء، وتعتبر هذه البروزات مناطق ضعف فى الطبقة الثنائية الليبيدات المكونة للغشاء الخارجى. ويجب عدم اعتبار هذه الزوائد التى قد توجد على السطح الخارجى للبروتوبلاست دليل على بداية حدوث انقسام.



شكل ٦-١٦: البروتوبلاست المعزول من خلايا الأوراق.

بالطبع الغشاء البلازمى غير قوى التركيب مقارنة بالجدار الخلوى ولذا يعتبر البروتوبلاست شديد الحساسية للظروف الخارجية والحركة الميكانيكية. وتسبب هذه العوامل ضرر شديد أو انفجار أو على الأقل فقد الحيوية والقدرة على التكشف. وعلى هذا يجب توخى الحذر الشديد أثناء فصل وزراعة البروتوبلاست. وبصورة عامة فإن البروتوبلاست الكبير الحجم مثل ذلك المعزول من خلايا الميزوفيل أشد حساسية للظروف المحيطة عن البروتوبلاست الصغير الحجم المعزول من المعلق الخلوى، وينبغى أن يشار إلى وجود عوامل أخرى غير الحجم تؤثر فى حساسية وحيوية البروتوبلاست.

عزل البروتوبلاست

استهلت هذه الطريقة مبكراً على يد Klercker في عام ١٨٩٢حيث عزل البروتوبلاست بعد تقطيع الأنسجة إلى أجزاء صغيرة ووضعها في محلول مناسب يعمل على بلزمة الخلايا فتحرر البروتوبلاست من تلك التى قطع جدارها الخلوى بدون اصابة الغشاء السيتوبلازمى. لكن حتى الآن تعتبر الطرق الميكانيكية غير جيدة لأنها تنتج محصول قليل من البروتوبلاست. أما تعتبر عملية فصل البروتوبلاست من العمليات البسيطة من الناحية النظرية بواسطة بعض الأنزيمات المحللة للسكريات العديدة المكونة للجدار الخلوى. ويستقبل البروتوبلاست المحرر فى وسط ذو ضغط اسموزى مرتفع لمنع انفجاره. لكن من الناحية العملية هناك العديد من العوامل التى تؤثر فى محصول البروتوبلاست وحيويته وتكشفه بعد ذلك، ومن هذه العوامل ما يتعلق بالنسيج النباتى أو المعلق الخلوى المستعمل كمصدر للبروتوبلاست والإنزيمات المستخدمة لهدم الجدار الخلوى وبعض الظروف البيئة الأخرى.

لذا فإنه لابد من إجراء عدة تجارب لمعرفة هذه العوامل للوصول إلى التوليفة المثلى لنجاح عزل وزراعة البروتوبلاست. فقد تكون الظروف المناسبة لعزل بروتوبلاست صنف ما غير مناسبة لصنف آخر من نفس النوع النباتى. وفى معظم التجارب يكون المصدر الشائع لفصل البروتوبلاست هو الأوراق، إذ تحتوى أنسجة الورقة غالباً على بروتوبلاست ذو قدرة عالية على الانقسام بعد العزل والزراعة. ويفضل أن يتم الحصول على الأوراق من نباتات نامية فى القوارير أو البيت المحمى للتحكم فى درجات الحراة والضوء والعناصر المغذية . وينجح استخدام أنسجة الأوراق صغيرة العمر حديثة الإنبساط مع العديد من النباتات ذات الفلقتين، لكن قد تكون هناك صعوبة فى حالة ذوات الفلقة الواحدة وعندها يمكن استخدام مزارع المعلق الخلوى. وفى بعض الحالات كان البروتوبلاست المعزول من أجزاء نباتية أخرى ذو قدرة أعلى على

الانقسام وأكثر ملائمة لأغراض معينة كاستعمال بروتوبلاست حبوب اللقاح للحصول على نباتات أحادية. وتحتاج الأنسجة المختلفة إلى تركيزات أعلى من إنزيمات الهضم أو مده أطول مقارنة باستعمال أنسجة الورقة. وقد تكون هذه المعاملات ذات تأثير سلبى على محصول البروتوبلاست وحيويته.

قد تشارك معظم الخلايا الموجودة فى النسيج المستعمل فى محصول البروتوبلاست المعزول ولذا يفضل استعمال نسيج يحتوى على نوع واحد من الخلايا كحبوب لقاح للحد من عدم تجانس البروتوبلاست الناتج. أو توفير الظروف المثلى لعزل بروتوبلاست نوع معين من الخلايا، فعل سبيل المثال يمكن فصل بروتوبلاست الخلايا الحارسة باستعمال تركيز مخفف جداً من الإنزيمات بالمقارنة مع باقى أنسجة الورقة. هذا وقد يحدث انتخاب تلقائى لبعض البروتوبلاست بسبب الاختلاف فى القدرة على تحرر بروتوبلاست بعض الخلايا دون غيرها، مثلاً من الصعب تحرر بروتوبلاست خلايا بشرة الأوراق. ويمكن بعد الفصل انتخاب بروتوبلاست نوع محدد من الخلايا إذا أمكن تميزه بصفة معينة كوجود صبغة معينه. وتقسم مراحل فصل البروتوبلاست إلى الخطوات التالية:

١. إعداد إنزيمات هضم الجدار الخلوى

يتكون الجدار الخلوى غالباً من ثلاث مواد عديدة التسكر هى cellulose, β 1-4 glucan, hemiclllulose وكذلك البكتين الذى يعتبر من الكربوهيدرات الأكثر تعقيداً. وعلى هذا لابد أن يحتوى المحلول الإنزيمى المستعمل لهدم الجدار الخلوى على إنزيمات cellulase, hemicellulase و pectinase. ويتم الحصول عليها من بعض الفطريات مثل *Aspergillus nigra, Trichodermia viride* أو بعض المصادر الأخرى كبعض القواقع. ويختلف الفعل الإنزيمى قليلاً لكنه قد يكون مؤثراً باختلاف مصدره ومن ثم قد يضطر إلى تجريب إنزيمات من مصادر مختلفة للتغلب على الاختلافات الموجودة فى

تركيب الجدر الخلوية فى الأنواع المختلفة أو فى نفس الخلايا النامية تحت ظروف متباينة. ومن النادر استعمال إنزيمات عالية النقاوة نظراً لارتفاع ثمنها ولأن الشوائب كالإنزيمات الأخرى لها أثر إيجابى فى هدم الجدار الخلوى وحتى بعض المستحضرات النقية مثل cellulase R-10 تحتوى على كميات من إنزيمات أخرى.

وتحتوى المستحضرات التجارية لإنزيمات الفصل مثل Driselase على خليط من إنزيمات cellulase, hemicellulase و laminarinase و xylanase و pectinase وهو ذو فاعلية فى عملية العزل. لكن يجب أن يؤخذ فى الاعتبار أن بعض الشوائب مثل proteases و lipases و ribonuclases وبعض المواد الفينولية والأملاح لها تأثير سلبى على كمية البروتوبلاست المعزولة وكذلك حيوية البروتوبلاست وقدرته على التكشف. ولهذا قد تتم عملية تنقية جزئية لمحلول الإنزيمات المستعمل بالترشيح فى حالة مواجهة بعض الصعوبات فى عملية الفصل والزراعة. ومن المهم أن يقلل زمن تعرض الخلايا لمحلول الهضم، لتقليل الضرر الحادث من الإنزيمات والشوائب إلى أقل حد ممكن. ويتراوح زمن الهضم فى الغالب من ٤-١٢ ساعة وباستعمال ١٠ مل من مخلوط الهضم لكل جرام واحد من الأنسجة. ويتم ذلك على درجة الحرارة ٢٥-٣٠° م على الرغم أنها ليست المثلى لعمل إنزيمات الهضم والتى تتراوح بين ٤٠-٥٠ ° م ورقم هيدروجينى ٤.٧-٦.٠.

قد لا تتمكن الإنزيمات المضافة للنسيج المستعمل لعزل البروتوبلاست من الوصول إلى الجدار الخلوى مباشرة حيث تمثل طبقة الكيوتيكل والبشرة الخارجية عائقاً لوصول الإنزيمات والتى تعتبر جزئيات ذات حجم كبير نسبيا إلى الجدر الخلوية. ولتسهيل عمل الإنزيمات يقطع النسيج المستعمل بعد نزع طبقة البشرة باليد إن أمكن إلى شرائح صغيرة بعرض ١-٢ مم، أو يتم عمل بعض الجروح السطيحة فى النسيج باستعمال فرشاة ناعمة. وعادة يمكن الحصول على مليون إلى ٥٠ مليون بروتوبلاست

من جرام واحد من أنسجة الأوراق حديثة النمو. أما الكالس فيجب تقسيمه إلى أجزاء صغيرة قبل المعاملة بالإنزيم. وقد يتم إضافة المحلول المستعمل للهضم تحت تفريغ لتمكين الإنزيمات من النفاذ إلى الجدر الخلوية، وقد تمكن (Scott et al., 1978) باستخدام التفريغ تقليل الوقت الضرورى لعمل الإنزيمات من ساعتين إلى عدة دقائق. ويرى البعض وضع المخلوط مع الأنسجة على أجهزة رج ذات سرعة منخفضة جداً لتسهيل عمل الأنزيمات وعزل البروتوبلاست.

٢. ضبط الضغط الاسموزى لوسط الفصل

كما سبق القول يعتبر الضغط الاسموزى للمحلول المستعمل فى فصل البروتوبلاست العامل المحدد لنجاح هذه الخطوة. ويتباين الضغط الاسموزى للبروتوبلاست طبقاً لظروف نمو النبات الأم ونوع النسيج. والبروتوبلاست أكثر ثباتاً فى المحلول ذو الأسموزية العالية عن المنخفض، فإذا استعمل محلول له ضغط اسموزى ذو قيمة سالبة عالية جداً حدثت بلزمة شديدة فى البروتوبلاست فيمنع انفجاره وبرعمته. لكن تعتبر البلزمة نوع من الإجهاد الخلوى فيلاحظ انخفاض فى حيوية البروتوبلاست ويزيد نشاط إنزيم nuclease وتقل عدد الريبوسومات وينخفض معدل امتصاص الأحماض الأمينية. وربما يرجع ذلك إلى انخفاض معدل تخليق البروتين وبعض عمليات التمثيل الأخرى. أضف إلى ذلك زيادة امتصاص بعض المواد السامة للبروتوبلاست بسبب البلزمة حيث تزيد نفاذية الغشاء لهذه الجزئيات. ولهذا السبب قد تتم عملية البلزمة كخطوة منفصلة قبل عزل البروتوبلاست إذا كانت الخلايا شديدة الحساسية للبلزمة للحد من امتصاص الجزيئات الضارة. ويتم ذلك باستعمال محلول ذو ضغط اسموزى مرتفع أولا حتى لا يسبب انفجار البروتوبلاست ثم تضاف إنزيمات هدم الجدار.

ويتم ضبط الضغط الاسموزى لوسط العزل باستعمال بعض المواد ذات الضغط الاسموزى العالى والتى قد تكون أملاح متأينة مثل كلوريد الكالسيوم بتركيز ٥٠-١٠٠

مليمول أو البوتاسيوم أو سلفات الماغنسيوم (٤٠ مليمول). وتلك المركبات لا تدخل فى عمليات التمثيل بالمرة أو تتم لها عملية التمثيل ببطء وبذلك يحافظ على الضغط الاسموزى للوسط. ويفضل استعمال مواد غير متأينة للغرض ذاته وهى عبارة عن السكريات الكحولية مثل السوربيتول والمانيتول (بتركيز ٤٥٠-٧٠٠ مليمول) والتى لا تدخل فى عمليات التمثيل لذا يظل الضغط الاسموزى للوسط ثابتاً. أما سكريات الفركتوز والجلوكوز والسكروز فنادراً ما تستعمل حيث يحدث لهما هدم فى الخلايا وبذلك يتغير الضغط الاسموزى للوسط مسبباً بعض المشاكل. وبالرغم من ذلك قد يستعمل السكروز بتركيز ٠.٣-٠.٧ مولر أو الجلوكوز إذا كان من المرغوب حدوث ارتفاع تدريجى فى الضغط الاسموزى. ولنفس السبب يمكن استعمال خليط من المواد النشطة أيضياً مع مادة غير نشطة.

٣. المعاملة الأولية للجزء النباتى المستعمل

إن ظروف نمو النسيج النباتى المستعمل لعزل البروتوبلاست فى غاية الأهمية لنجاح عزل وزراعة البروتوبلاست. ومن هذه العوامل الحرارة، والضوء، والرطوبة، وعمر النسيج. وتعتبر الظروف المثلى لنجاح ذلك محل تجريب لتباين تركيب الجدار الخلوى تحت ظروف النمو المختلفة. وعموماً تعمل الظروف المثلى لنمو وانقسام الخلايا على زيادة محصول البروتوبلاست المعزول نظراً لقلة سمك الجدار الخلوى وربما تساعد على التكشف لاحقاً. ويمكن تحقيق ذلك بتنمية النباتات فى الظلام لمدة ٢٤-٧٢ ساعة وعلى درجة حرارة ٤-١٠° م قبل استعمالها كمصدر للبروتوبلاست، أو زيادة معدل التسميد الأزوتى للنباتات. أما إذا كان مصدر البروتوبلاست هو المعلق الخلوى فينصح بتجديد المعلق المستعمل كل أسبوع مع زيادة نسبة الأوكسين المستعمل وتقليل الكربوهيدرات فى بيئة النمو قبل استعمال المعلق لعزل البروتوبلاست. ويؤثر عمر النبات المستعمل فى عملية نجاح عزل البروتوبلاست، فمثلاً يتم عزل بروتوبلاست

الدخان وعمر النبات ٤٠-٦٠ يوم بعد الإنبات وذلك للحصول على بروتوبلاست ذو حيوية عالية ولأسباب غير معروفة وجد أن كمية البروتوبلاست المعزولة من أنسجة النباتات المزهرة منخفضة. وينصح باستعمال مزارع الأشطاء لسهولة التحكم في ظروف النمو. وفى حالة استخدام المعلق الخلوى يجب تجديد المزرعة كل ٣-٧ أيام وتؤخذ الخلايا وهى فى الطور اللاجى.

٤. تنقية البروتوبلاست

بعد معاملة الأنسجة بالإنزيمات يتم تحريك الأنسجة بلطف حتى يتحرر البروتوبلاست من الأنسجة. ويجب الإسراع فى إزالة مخلوط الإنزيمات وبقايا الأنسجة المتحللة وكذلك البروتوبلاست غير الحى والخلايا الميتة بمجرد عزل البروتوبلاست من الجدار الخلوى خاصة إذا كان مصدر البروتوبلاست أنسجة نباتية. حيث يتحرر منها بعض الإنزيمات والمواد الفينولية التى قد ترتبط ببعض الإنزيمات غير النشطة وتنشطها مما يقلل من حيوية البروتوبلاست. ويتم ذلك غالباً بفصل ناتج عملية الهضم باستخدام مصفاة لحجز بقايا الخلايا كبيرة الحجم ثم استخدام قطعة من قماش النيلون ذات أقطار ٥٠-١٠٠ ميكروميتر لتسمح بمرور البروتوبلاست. وتضمن هذه الطريقة الحصول على بروتوبلاست ذو أقطار واحدة. وللحد من التأثير الضار للخلايا الميتة والمصابة اضاف Ochatt & Power (1992) محلول ٠.٥% من potassium dextran sulphate لمحلول الهضم. وبعد هذا الفصل المبدئى يمكن استعمال الطرد المركزى عدة مرات وإعادة انتشار البروتوبلاست فى وسط جديد ذو ضغط اسموزى مناسب (٢٠% سكروز على سبيل المثال). ويجب توخى الحذر الشديد واستعمال سرعة منخفضة لجهاز الطرد المركزى (100 g) لمدة ٧-١٠ دقائق حتى لا يحدث ضرر للبروتوبلاست السليم. يتم بعدها سحب البروتوبلاست السليم الطافى فى المنطقة الفاصلة بين المحلول السكرى ومحلول استخلاص البروتوبلاست بحذر شديد باستعمال ماصة ذات فتحة واسعة ويعاد

انتشار البروتوبلاست فى وسط جديد لإعادة التنقية مرة أخرى. وهناك طرق أخرى لإجراء عملية التنقية تعتمد على نفس الأساس السابق. ويمكن الاستدلال على حيوية البروتوبلاست بعد الفصل باستعمال بعض الصبغات التى تميز الأغشية الحية مثل Flurescein diacetate (FAD) و Pheosafranine و Calcofluor White (CFW) لكن الدليل القاطع على حيوية البروتوبلاست وجدوى الطريقة المستعملة للفصل هو تكوين الجدار الخلوى وحدوث الانقسام الخلوى.

يعتبر البروتوبلاست خلية نباتية تحت ظروف إجهاد من المحلول الاسموزى والمواد الأخرى الموجودة بمحلول العزل وكذلك المواد الناتجة من أيض البروتوبلاست نفسه. وتسبب عديد من هذه المؤثرات بلزمة للبروتوبلاست، ويكون معظم الإجهاد راجعاً لتأثير البلزمة والضغط الاسموزى وليس لإزالة الجدار الخلوى فى حد ذاته. وبمجرد إزالة مخلوط الإنزيمات فإن البروتوبلاست يتجه إلى الأقلمة مع الظروف الجديدة. وقدرة البروتوبلاست المعزول من المعلق الخلوى على الأقلمة أعلى من ذلك المعزول من أنسجة نباتية، حيث أن ظروف نمو المعلق الخلوى تشبه إلى حد كبير ظروف عزل وزراعة البروتوبلاست إن لم تكن واحدة. لكن حتى فى الظروف المثلى من الضغط الاسموزى وخلافة فإن بعض البروتوبلاست ينفجر لإسباب غير معروفة ويستمر ذلك غالباً لمدة يوم.

وبمجرد الأقلمة يلاحظ سرعة معدل تخليق البروتينات خاصة تلك المسئولة عن مقاومة الإجهاد ويعاد تخليق الجدار الخلوى. ويعتبر بدء تغيير الشكل الخارجى للبروتوبلاست من الكروى إلى المستطيل هو مؤشر تخليق الجدار الخلوى، كما يلاحظ زيادة فى معدل تخليق عضيات الخلية والتنفس والأحماض النووية فى هذه المرحلة. ومن غير المعروف حتى الآن لماذا لا يستمر انقسام البروتوبلاست فى غياب الجدار الخلوى إلا أن هذه حقيقة مؤكدة. ويبدأ التكوين التلقائى لمكونات الجدار الخلوى عقب الطور

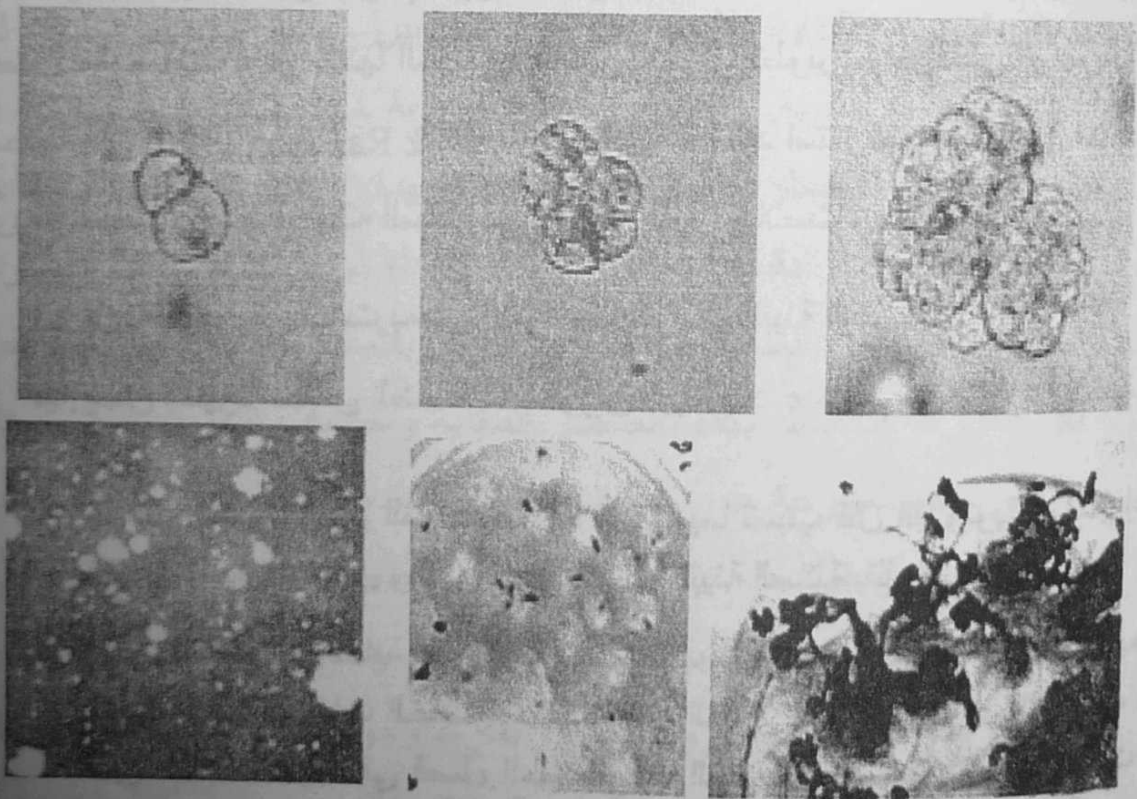
اللاجى Lag من مراحل نمو الخلية وقد يحدث ذلك أيضاً أثناء عمليات الأقلمة. وتختلف مدة الطور اللاجى للبروتوبلاست باختلاف الأنواع النباتية وغالباً تتراوح بين ثلاث ساعات ويومين فى *Brassica*، وتصل فى البقوليات إلى أربعة أيام وتطول هذه المدة إلى أسبوع فى بعض الأشجار. ويمتاز الجدار الخلوى المتكون حديثاً بقصر السلاسل السيليولوزية المكونة له مع غياب الهيمسليولوز والذى يلاحظ وجوده بتركيز عالى فى البيئة المحيطة،وذلك لعدم وجود عدد كاف من لويفات السيلولوز لربط الهيمسليولوز ضمن مكونات الجدار (Razdan, 2002).

أما بعد الزراعة فيتطلب التغير الحادث فى مزارع البروتوبلاست نتيجة الأقلمة للظروف الجديدة وإصلاح الضرر الواقع عقب نزع الجدار الخلوى وتكوين الجدار الجديد مكونات بيئية محددة تتلاءم مع العمليات الأيضية الجديدة. فعلى سبيل المثال وكما ذكر سابقاً لابد من خفض قيمة الضغط الاسموزى تدريجيا إما بإضافة بيئة جديدة ذات ضغط اسموزى منخفض أو باستعمال مواد ذات ضغط اسموزى مرتفع لكنها تدخل فى عمليات التمثيل مثل السكروز فينخفض مقدار الضغط الاسموزى للبيئة تدريجيا. كذلك تقل الحاجة للأوكسينات تدريجاً حيث تتطلب المزرعة فى البداية تركيز عالى منها لدفع عملية الانقسام، ويستثنى من ذلك بروتوبلاست النجيليات حيث يحتاج إلى تركيز منخفض من الأوكسين فى البداية ثم تركيز مرتفع منها لاحقاً. ولتحقيق إمكانية تغير محتويات البيئة فإن البروتوبلاست يزرع فى بيئة سائلة فى البداية. ويثبط الضوء الشديد انقسام بروتوبلاست خلايا ميزوفيل أوراق الدخان لذا يفضل زراعة البروتوبلاست عموماً فى الظلام ثم ينقل بعد ذلك للضوء (Bhojwani &Razdan, 1996).

٥. زراعة البروتوبلاست

يدخل البروتوبلاست فى سلسلة من الانقسامات فى بيئة الزراعة الجديدة ليكون كتلاً جديدة من خلايا الكالس. وقد أمكن توجيه هذه الانقسامات فى بعض الأنواع لتكوين

أجنة جسدية تتكشف إلى نباتات كاملة كما فى الشكل رقم (٦-١٧). واستخدمت هذه الظاهرة بنجاح فى التحسين النباتى لبعض النباتات بتحوير المحتوى الوراثى للبروتوبلاست قبل اعادة تكوين الجدار الخلوى والانقسام حيث يمكن إدخال البلازميد إلى البروتوبلاست. وتختلف زراعة البروتوبلاست عن زراعة الخلايا النباتية من حيث ضرورة استعمال بيئة ذات ضغط اسموزى مرتفع، والفرق الثانى هو اختلاف عمليات الأيض والتكشف فى مزارع البروتوبلاست عن مزارع الخلايا حيث تتم إعادة تكوين الجدار الخلوى وانقسام الخلايا وتكون الكالس قبل التكشف. ولابد من ضمان وجود عدد من المركبات العضوية أو بعض المواد المغذية المعقدة التركيب الهامة فى إعادة تكوين الجدار الخلوى، وعلى هذا يلاحظ الاختلافات التالية فى مكونات بيئة زراعة البروتوبلاست (Veilleux *et al.*, 2005):



شكل ٦-١٧: توالى انقسام البروتوبلاست فى الصف العلوى ثم تكوين الكالس (أسفل يسار) وتكوين الأجنة الجسدية وإنبات نباتات البرسيم الحجازى (أسفل وسط ويمين) (www.medicago.com)

١. تعتبر الأمونيا مهمة لإنقسام الخلايا لكنها عند تركيز ٢٠ مليمول تعتبر سامة للبروتوبلاست وتقلل من حيوية البروتوبلاست. ولذا يجب خفض تركيزها الى نصف أو ربع التركيز الشائع فى البيئات المعتادة.

٢. احتوائها على ضعف التركيز المستعمل فى زراعة الأنسجة من الحديد والزنك.

٣. زيادة تركيز الكالسيوم بمعدل ٢ :٤ مرات لمنع تجمع البروتوبلاست فى كتل بنية اللون فى المراحل الأولى من الزراعة، على أن يتم خفض تركيز الكالسيوم عقب تكوين الجدار الخلوى واستهلال الانقسام.

نظراً للحساسية الشديدة للبروتوبلاست لمكونات البيئة لابد من تلافى وجود بعض المواد التى قد تسبب سمية مثل الآجار والذى يستعاض عنه باستعمال الآجاروز عالى النقاوة. يجب ان تتم زراعة وتداول البروتوبلاست فى الظلام أو ضوء شاحب لحساسيته الشديدة للضوء. وتتم الزراعته فى البيئة المغذية شبه الصلبة والتى تبدو أنها أفضل لنموه حيث يوفر ثباتها الظروف المثلى للنمو والتطوير. ولكن على الرغم من هذه الحقيقة فإن Bhojwani & Razdan (1996) يوضح بعد استعراض العديد من الدراسات اربعة أسباب لإستخدام البيئة السائلة فى زراعة البروتوبلاست وهى:

أ. لا ينقسم بروتوبلاست بعض الأنواع النباتية فى البيئة المتصلبة.

ب. يمكن بسهولة خفض الضغط الأسموزى للبيئة بعد عدة أيام من الزراعة بتخفيف البيئة.

ج. بفرض تخليق بعض المواد الضارة التى ربما تسبب قتل البروتوبلاستأثناء إعادة تكوين الجدار الخلوى والنمو فإن استعمال البيئة السائلة يقلل من هذا الضرر.

د. يمكن التحكم فى كثافة البروتوبلاست عقب الزراعة كذلك إمكانية عزل بعض الخلايا ذات الصفات الخاصة عقب تكوين الجدار بعد عدة أيام من الزراعة، وإن كان هناك صعوبة فى فصل المستعمرات الفردية حيث يميل البروتوبلاست إلى التجمع فى صورة مجموعات. وتتم زراعة البروتوبلاست فى كلتا البيئتين بعدة طرق منها:

١. زراعة البروتوبلاست فى صورة معلق فى طبقة رقيقة جداً من البيئة السائلة فى طبق بترى.
٢. زراعته فى طبق بترى فى شكل قطرات دقيقة جداً بحجم ١٠٠ - ٢٠٠ ميكروليتر.
٣. الزراعة فيما يعرف بالنقطة المعلقة وحجمها ١٠-١٠٠ ميكروليتر على السطح الداخلى لغطاء طبق بترى.
٤. الزراعة فى بيئة سائلة فوق بيئة شبة صلبة.
٥. استعمال المزرعة الحاضنة إذا كان هناك ضرورة لزراعة البروتوبلاست فى صورة فردية كأن تتم الزراعة بعد دمج البروتوبلاست أو الرغبة فى انتخاب طراز معين من البروتوبلاست بعد إجراء تعديل وراثى. حيث يتعارض ذلك مع ضرورة زراعة البروتوبلاست بكثافة تتراوح بين خمسة الآف إلى مليون لكل ملليتر واحد من البيئة. والتركيز الأمثل للزراعة هو خمسون ألف حتى يتسنى للبروتوبلاست الانقسام والنمو. ولتحقيق ذلك يمكن تقليل حجم المزرعة جداً باستعمال القطرات الدقيقة المعلقة. أما الطريقة الأخرى فهى استعمال المزرعة الحاضنة التى تمكن العدد القليل جداً من البروتوبلاست من النمو والانقسام حيث تقوم المزرعة الحاضنة بمده بالعناصر المغذية ومتطلبات النمو الأخرى. وغالباً ما تكون هذه المزرعة هى نفس الخلايا التى استعملت كمصدر للبروتوبلاست بشرط أن تكون فى حالة نشطة من النمو مع ضرورة الفصل الميكانيكى بين المزرعة الحاضنة والبروتوبلاست. ويتم ذلك إما بوضع غشاء فاصل بين الاثنين أو خلط هذه الخلايا مع البروتوبلاست، بشرط وجود ما يميزها كاحتوائها على صبغة لا توجد بالبرتوبلاست. كما استعملت خلايا معرضة للإشعاع لتثبيط انقسامها أو استعمال راشح نمو المعلق الخلوى حيث أنه يحتوى أيضاً على المواد اللازمة للنمو.

٦. الزراعة فى بيئة صلبة وهو مايعرف بـ Bergmann cell plating technique عن طريق خلط كمية من معلق البروتوبلاست تركيزها يساوى ضعف التركيز النهائى المطلوب من البروتوبلاست مع البيئة المستعملة للزراعة على أن تكون محتوية على ضعف التركيز النهائى من الآجاروز والمواد الأخرى. ويتم الخلط برفق والبيئة على درجة حرارة ٤٥°م ثم تصب فى طبقة رقيقة فى أطباق بترى وتغلق ثم تحضن. وبعد نجاح تكوين المستعمرات يتم فصلها وزراعتها بصورة فردية. ويلاحظ توقف انقسام البروتوبلاست فى بيئة الزراعة إذا لم يتم تعديل الضغط الاسموزى عقب الانقسامات الأولى للخلية.

وكما أن هناك حد أدنى من الكثافة لزراعة البروتوبلاست فهناك أيضاً حد أعلى حيث يجب ألا تزيد كثافة الزراعة عن مليون بروتوبلاست لكل مل من البيئة. حيث تؤدى زيادة التركيز إلى زيادة عدد البروتوبلاست غير السليم والتنافس على مكونات البيئة. ويجب التنويه إلى أنه لا يمكن معالجة عدم النقاوة بزيادة عملية التنقية حيث يسبب ذلك ضرر للبروتوبلاست السليم.

يمكن التعرف على نجاح زراعة البروتوبلاست من السلوك المبدئى له أثناء الإعداد للزراعة وأول هذه الملاحظات هى بدء التحول من الشكل الكروى المميز للبروتوبلاست وحدوث انتفاخ للخلية مما يعكس النشاط التمثيلى وبدء تكوين الجدار الخلوى (شكل رقم ٦- ١٨). ويمكن الاستدلال على تكوين الجدار الخلوى بالصبغات المميزة لمكونات الجدار. وتحدث هذه العملية خلال ٢-٤ يوم من الزراعة طبقاً للنوع النباتى. ويحدث الانقسام الأول للخلية بعد ذلك بفترة وجيزة من تكوين الجدار، ومن الثابت عدم الإنقسام إلا عقب تكوين الجدار، وبفشل تكوين الجدار يلاحظ برعمة البروتوبلاست وربما زيادته فى الحجم عدة مرات وتعدد النويات ويعد عدم الغسيل الجيد للبروتوبلاست واحتواء المعلق البروتوبلاستى على بروتوبلاست حى وآخر ميت تتحرر منه بعض المواد الضارة احد اسباب فشل الإنقسام. وإذا كان عدد البروتوبلاست الذى

مات قبل الزراعة كبير فلابد من تخفيف البيئة المستعملة لنضمن بالتالى تخفيف تركيز المواد السامة في البيئة.



شكل ٦-١٨: انقسام البروتوبلاست عقب عزله ويلاحظ البروتوبلاست الكروى فى أعلى الصورة يمين وأسفل يسار، ومرحلة مبكرة من الانقسام أعلى يسار. أما فى أسفل الصورة يمين بروتوبلاست وقد كون الجدار الخلوى وتم الانقسام (Veilleux *et al.*, 2005).

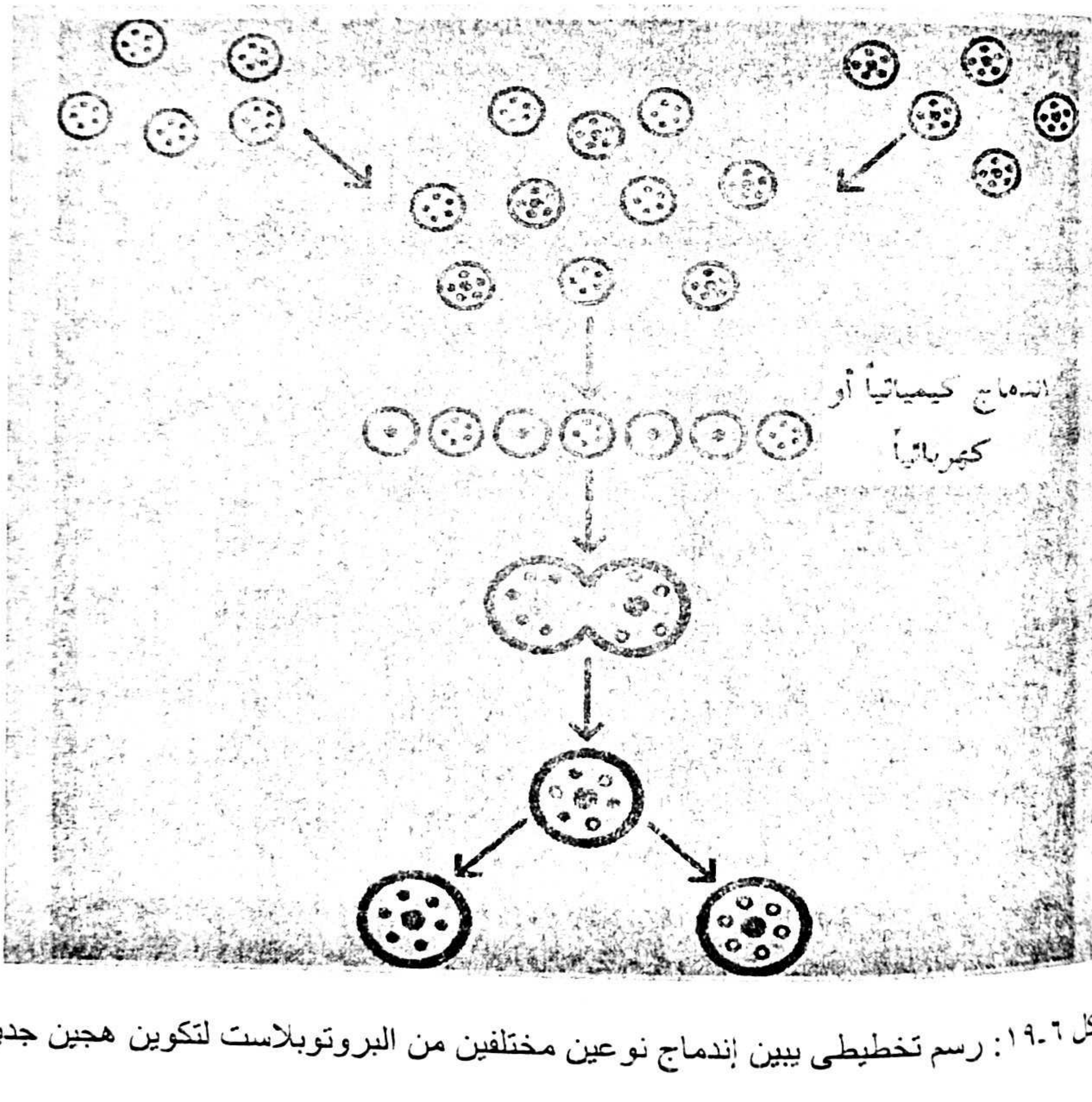
ويلاحظ تكوين مستعمرات فردية ناتجة من انقسام البروتوبلاست خلال ٣-٦ أسابيع من الزراعة التى يمكن فصلها وزراعتها بصورة فردية. كما سبق القول يتمكن بعض البروتوبلاست عقب الزراعة من الانقسام وتكوين مستعمرات فردية ويطلق على النسبة بين البروتوبلاست الذى تمكن من النمو والانقسام والعدد الكلى للبروتوبلاست المنزرع مصطلح كفاءة الزراعة plating efficiency وتختلف هذه النسبة باختلاف الأنواع والطرز الوراثية حتى شديدة القرابة وكذلك طريقة العزل والزراعة،وغالباً ما تكون هذه النسبة منخفضة. وقد أورد Bhojwani & Razdan (1996) العشرات من الدراسات حول استخدام مزارع البروتوبلاست فى الإكثار الدقيق.

دمج البروتوبلاست وإنتاج الهجن الجسدية

حتى بداية السبعينيات من القرن الماضى لم تكن هناك طريقة لنقل صفة وراثية من نبات إلى آخر سوى التهجين الجنسى. حتى استطاع Power *et al.* (1970) إجراء أول عملية دمج بروتوبلاستى بين بروتوبلاست الذرة والشوفان. وبالرغم من فشل هذه المحاولة فى الحصول على نبات بعد الدمج إلا أنها كانت بمثابة بداية تطوير هذه التقنية واستخدامها فى التحسين الوراثى للنبات، إذ استطاع بعدها Carlson *et al* (1972) بالتعاون مع آخرين الحصول على أول نبات هجين باستعمال الدمج بين بروتوبلاست *N*icotiana *G*lauca و N. Langsdorffii. وفى عام ١٩٧٨ كان النجاح العملى لهذه التقنية على يد Melchers *et al.* (1978) بالتغلب على عدم التوافق الموجود بين الأجناس والحصول على هجين جسدى سمى Pomato ناتج من تهجين جنسين مختلفين هما البطاطس Solanum Tuberosum والطماطم Lycopersicum esculentum لكن كانت كل النباتات الناتجة عقيمة.

وتجدر الإشارة إلى أنه من الممكن حدوث دمج تلقائى للبروتوبلاست أثناء العزل حيث يلاحظ وجود خلايا عديدة الانوية وبالفعل تم تأكيد ذلك بالفحص الدقيق بالمجهر الإلكترونى، لكن معدل النجاح بالاعتماد على الدمج التلقائى ضعيف جداً. وقد ساهمت التقنية الحديثة فى زراعة الأنسجة من استعمال زراعة الخلايا والبروتوبلاست والذى يعتبر أصغر وحدة حية من النبات فى التحسين الوراثى لبعض النباتات الهامة اقتصادياً. حيث يمكن إجراء الدمج الخلوى (شكل رقم ٦-١٩) والتحول الوراثى والانتخاب على مستوى البروتوبلاست (Johnson & Veilleux, 2001) و (Rakoczy-Trojanowska, 2002) ونظرياً يمكن دمج أى نوعين من البروتوبلاست إذا توفرت الظرف الملائمة لذلك بصرف النظر عن مصدر البروتوبلاست. ويمكن عن طريق هذه التقنية تحقيق الكثير من المميزات والتى قد تكون مستحيلة بالطرق التقليدية ومن تلك التطبيقات:

١. إمكانية نقل صفات هامة كمقاومة إجهاد بيئى أو حيوى من نبات إلى آخر والتى قد لا يمكن أن تتحقق بالتهجين الجنسي. فعلى سبيل المثال تم الحصول على هجين مقاوم لبعض الأمراض باستعمال بروتوبلاست Solanum tuberosum و *S.* Brevidens وكذلك هجن Brassica مع أحد الأجناس البرية التابعة لها مقاوماً لبعض الأمراض الفطرية والبكتيرية. أما الهجين الجسدى للطماطم مع النبات البرى L. peruvianum فقد كان مقاوماً للصقيع. وقد عدد Chawla (2000) هذه الهجن الضمن أربعين هجينا مختلفاً تم الحصول عليها بدمج البروتوبلاست لنقل الصفات المقاومة للأمراض، الحشرات، الملوحة، مبيدات الحشائش وكذلك زيادة إنتاج بعض المركبات الثانوية، ويوضح جدول رقم (٦-٢٤) بعض هذه الهجن.



شكل ٦-١٩: رسم تخطيطى يبين إندماج نوعين مختلفين من البروتوبلاست لتكوين هجين جديد.

٢. إمكانية الحصول على نباتات رباعية العدد الكروموسومى وكذلك النباتات الشبيه بالثنائى Amphidiploids فى حالة صعوبة ذلك باستعمال الكوليشيسين.
٣. الحصول على هجن من نباتات تحمل صفة العقم الذكرى أو من نباتات ذات أعضاء جنسية غير تامة التكوين. فقد أمكن بدمج بروتوبلاست نباتات بطاطس أحادية متضاعفة بها صفة العقم الذكرى الحصول على نباتات رباعية خصبة.

جدول ٦-٢٤: بعض الهجن ذات الصفات الجديدة والتى تم الحصول عليها من دمج بروتوبلاست أنواع مختلفة (Chawla, 2000).

الهجين الجسدي	الصفة الجديدة للهجين
Nicotiana nesophila X *N. tobacum*	مقاومة فيروس تبرقش الأوراق
N. rustica X *N. tobacum*	زيادة تركيز النيكوتين
Solanum chacoense X *S. tuberosum*	مقاومة فيروسX
S. brevidens X *S. tuberosum*	مقاومة فيروس التفاف الأوراق
S. circalifolium X *S. tuberosum*	مقاومة *Phytophthora*
S. commersonii X *S. tuberosum*	مقاومة الصقيع
S. sisymbrifolium X *S. tuberosum*	مقاومة النيماتودا
Hordeum vulgare X *Daucus carota*	مقاومة الصقيع والملوحة
التهجين السيتوبلازمى Cybrid	**الصفة الجديدة للهجين**
N. sylvestris X *N. tabacum*	المقاومة لـStreptomycine
N. sylvestris X *N. tabacum*	المقاومة لمبيدات الحشائش Triazine
N. sylvestris X *N. tabacum*	نقل صفة العقم الذكرى السيتوبلازمي
S. acaule X *L. esculentum*	نقل صفة العقم الذكرى السيتوبلازمي

ء. التهجين بين نباتات غير بالغة والتى تصل إلى النضج الجنسى بعد مدة طويلة وهى نقطة هامة فى تربية النباتات.

د. من المعروف فى الإكثار الجنسى انتقال السيتوبلازم للنسل الجديد من النبات الأم فقط عبر البويضة أما حبة اللقاح فلا تحمل عضيات السيتوبلازم. وفى المقابل يتم نقل سيتوبلازم كلا الأبوين إلى النسل فى الدمج البروتوبلاستى، فيمكن بذلك نقل بعض الصفات كالمقاومة لبعض المبيدات أو العقم الذكرى التى قد توجد فى عضيات سيتوبلازم (الكلوروبلاست والميتوكوندريا) من كلا الأبوين إلى النسل. وغالباً يتم تكوين اتحادات جديدة من المادة الوراثية للميتكوندريا، وعلى العكس يندر تكوين هذا الاتحادات الجديدة للمادة الوراثية الموجودة بالكلوروبلاست Bhojwani & Razdan (1996). لكن يحدث إعادة انعزال جديدة حيث يحدث استبعاد لكلوروبلاست احد الأبوين وبهذا ينتج تركيب جديد يحمل بعض الصفات الوراثية لكلا الأبوين. ويمكن استبعاد نواة أحد الأبوين بالإشعاع مثلاً ويسمى الناتج فى هذه الحالة بـ Cybrids إذا لم يحدث دمج للنواتين أو Cytoplasmic hybrids إذا تم دمج النواتين. بمعنى أخر يمكن الحصول على هجين سيتوبلازمى فى خطوة واحدة دون الحاجة إلى إجراء ٨-١٢ دورة من التلقيح الرجعى. ويوضح جدول رقم (٦-٢٥) بعض الهجن التى تم الحصول عليها من دمج بروتوبلاست أجناس مختلفة، لكن كل هذه الهجن كانت عقيمه ولم تنتج بذور. لكن حتى بفرض وجود طرق مثلى لعملية العزل والدمج فإن هناك العديد من المشاكل والصعوبات التى تحد من استخدام تلك التقنية بغرض التحسين وهى:

١. صعوبة عملية الانتخاب بعد التهجين واحتمال عدم وجود طريقة لإحداث التكشف بعد الدمج.

٢. قد يكون الناتج النهائى لعملية التهجين غير متزن غالباً كأن يكون عقيم أو به خلل تركيبى أو غير ثابت خاصة لو تم بين آباء بعيدة من الناحية التقسيمية. أو حتى باستعمال خلايا فى مراحل مختلفة من التطور.

٣. نمو كالس به كيميرا بدلاً من الهجين إذا لم يتم الدمج النووى عقب دمج البروتوبلاست وتنقسم كل نواة مستقلة عن الأخرى وقدتفقد الكيميرا بعد ذلك أثناء التكشف.

٤. التهجين بين نباتين ثنائيين ينتج عنه نباتات Amphidiploid غير مرغوبة فى برامج التربية ويمكن التغلب على ذلك بتهجين خلايا أحادية.

٥. الناتج الوراثى لعملية التهجين متباين غالباً ويرجع ذلك إلى الاستبعاد الكروموسومى، الانتقال، الانعزال فى بعض عضيات السيتوبلازم مثل البلاستيدات والميتاكوندريا.
٦. انخفاض الثبات الوراثى فى مزارع البروتوبلاست كما أنه ليس من المؤكد أن تعبر الصفة محل الاهتمام عن نفسها فى النسل.

جدول ٦-٢٥: يوضح بعض الهجن التى تم الحصول عليها من دمج بروتوبلاست أجناس مختلفة (Chawla, 2000)

النوع النباتى الداخل فى عملية التهجين وعدد الكروموسومات المميز له	الجنس الجديد
Raphanus sativus (2n= 18) X *Brassica olerace* (2n=18)	Raphanobrassica
B. olerace (2n= 18) X *Moricandia arvensis* (2n= 27, 28)	Moricandiobrassica
Eruca sativa (2n= 22) X *B. napus* (2n= 38)	Erucobrassica
Diplotaxis muralis (2n= 42) X*B. napus* (2n= 38)	Diplotaxobrasica
N. tobacum (2n= 48) X *Lycropersicon esculentum* (2n= 24)	Nicotiopersicon
Solanum tuberosum (2n= 24,48) X *L. esculentum* (2n= 24)	Solanopersicon
Datura innoxia (2n= 48) X *Atropa belladona* (2n= 24)	Daturotropa
Oryza sativa (2n= 24) X *Echinochloa oryzicola* (2n= 24)	Oryzochloa
Arabidopsis thaliana (2n= 10) X *B. campestris* (2n= 20)	Arabidobrassica

طرق دمج البروتوبلاست

قبل البدء فى دمج البروتوبلاست لابد من التأكد من وجود البروتوبلاست الحى وبعدد وفير لضمان حدوث الدمج بنجاح. ولا يتوقف الأمر عند ذلك بل هناك

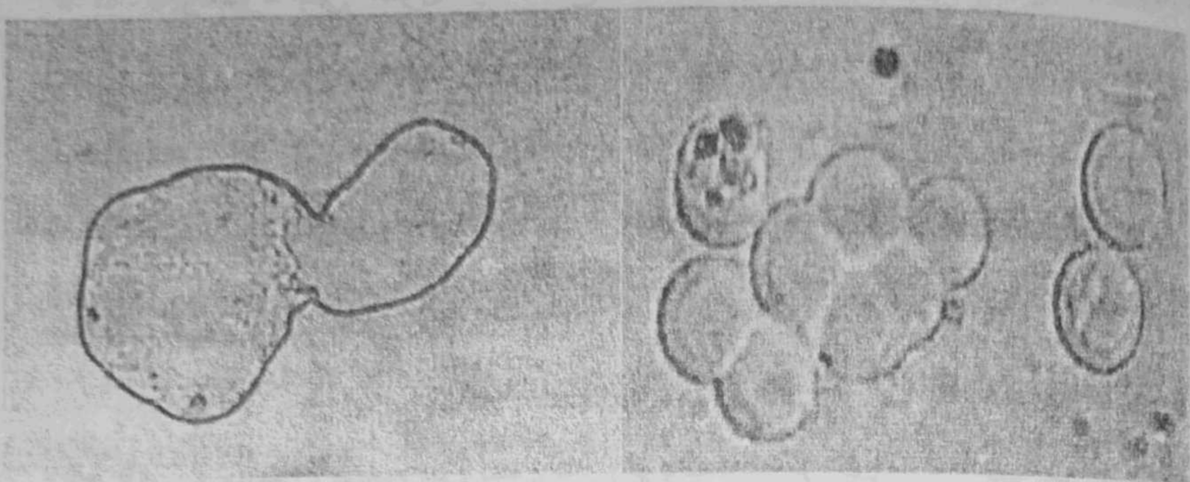
الكثير من الصعوبات العملية التى تعيق هذه العملية خاصة كلما قلت درجة القرابة بين النوعين. فبالرغم من أن الغشاء البروتوبلاستى غير قوى التركيب بالمقارنة مع الجدار الخلوى إلا أنه لا يزال يشكل عقبة ميكانيكية فى سبيل الدمج البروتوبلاستى. وفى الحقيقة يميل بروتوبلاست بعض الأنواع الدخان إلى الاندماج بسهولة بمجرد رفع الرقم الهيدروجينى إلى ١٠.٥ مع وجود تركيز عالى من أيونات الكالسيوم. (Melchers & Labib, 1974)، لكن هناك بعض الأنواع يصعب دمجها. ولكى يتم الدمج لابد أولا أن يكون البروتوبلاست ملاصقا للأخر فى مجموعات لا يزيد فيها البعد بين البررتوبلاستينى عن ١٠ انجستروم. لذا يجب التخلص من الشحنات الكهربائية الموجودة على الغشاء والتى تتراوح بين -١٠و-٣٠ مليفولت مسببا تنافر البروتوبلاست.

وذلك مع مراعاة العمل على عدم ثبات تركيب الغشاء لوقت قصير لتتكون قنطرة بين البروتوبلاستين تسمح بمرور السيتوبلازم من ناحية إلى أخرى أو يتم اتساع المنطقة المتهتكة بين الغشائين فيتم الدمج. ثم تأتى المرحلة الثالثة بإعادة الغشاء إلى وضعه ويسمى الناتج من هذه العملية fusion product أو heterokaryons. وإذا حدث الدمج بين النواتين عقب ذلك سمى الناتج هجين hybrid. وتعتبر عملية الدمج عملية غير متخصصة بمعنى أنه لا يمكن معرفة أى من البروتوبلاست الذى سيتم دمجه وليس هناك ما يمنع من أن يتم دمج بروتوبلاستين أو أكثر من نفس الأب ليكون homokaryon وربما لا يتحقق الهدف من الدمج بين النوعين محل التجربة.

يتم الدمج باستعمال طريقة كيميائية تعتمد على زيادة تركيز أيونات الكالسيوم فى وجود البولى إثيلين جليكول (Benbadis&Virville, 1982) أو بعض المواد الأخرى مثل polyvinyl acetate أو بعض اللبيدات، ويجب التخلص من هذه المواد عقب الدمج مباشرة. يعمل PEG على التخلص من الشحنات السالبة ونزع الماء

جزئياً من البروتوبلاست ثم تحدث هجرة للبروتينات المكونة للغشاء الخلوى فتتكون منطقة غنية فى اللبيدات تسبب تلاصق البروتوبلاستين مع بعضهما وتستغرق هذه الخطوة ١٥-٣٠ دقيقة. وبرفع تركيز أيون الكالسيوم إلى ٥٠ مليمول من $CaCl_2.2H_2O$ فى وسط قلوى يصل إلى ٩-١٠ يتم الدمج وبمعدل قد يصل إلى ١٠٠%. وتعتبر طريقة Kao & Michayluk (1974) المعتمدة على هذه الفكرة الاكثر استخداماً حتى الآن، ومع ذلك فإن الآلية الدقيقة للدمج بهذة الطريقة غير معروفة بدقة Bhojwani & Razdan (1996) . لكن يعيب هذه الطريقة صعوبة دمج نوعين مختلفين من البروتوبلاست، وحدوث معظم الدمج بين نفس البروتوبلاست. كما أن PEG يعتبر سام للخلايا، وقد سجل خلل فى تركيب الميتاكوندريا عند دمج بروتوبلاست بعض الأنواع (Bates, 1985) وكذلك يقلل من انقسام وتكشف البروتوبلاست بعد الدمج إن لم يتم التخلص من مخلوط الدمج بدقة قبل الزراعة. ولهذا السبب وبالرغم من انخفاض تكاليف هذه الطريقة بالمقارنة مع الطريقة الكهربائية إلا أنها أقل استعمالاً منها.

أما الطريقة الأخرى والتى كان أول استخدام لها بواسطة Senda *et al.* (1979) وتعرف بطريقة الدمج الكهربائية electrofusion. وهى طريقة سهلة وسريعة فلا تستغرق إلا ١٥ دقيقة. ويمكن بواسطتها التحكم فى إحداث الدمج بين نوعين مختلفين من البروتوبلاست، فقد استطاع Jones *et al.* (1990) الحصول على ١٢.٣% من الأشطاء الهجين بين *Solanum tuberosum* و *S. brevidens* بينما كانت هذه النسبة ٢.٦ % باستعمل PEG. أضف إلى ذلك ما أشار إليه Asao *etal.* (1994) من ارتفاع معدل الخصوبة للنباتات الناتجة بالدمج الكهربائى. وكما هو الحال فى الطريقة الكيمائية فإن الدمج يحدث فى مرحلتين الأولى هى إحداث تجمعات من البروتوبلاست فى شكل سلسلة سبحية بين القطب السالب والموجب والثانية هى دمج الأغشية مع بعضها كما فى الشكل رقم (٦-٢٠).



شكل ٦-٢٠: تلاصق بروتوبلاستين كمرحلة سابقة لعملية الدمج على اليمين. وعلى اليسار يلاحظ حدوث اتصال تام بين الغشاءين السيتوبلازميين ودمج البروتوبلاستين معاً (Gürel *et al.*, 2002).

ويتم ذلك بوضع البروتوبلاست فى غرفة صغيرة تحمل على شريحة مجهرية. يتصل بالغرفة محقن مجهرى به البروتوبلاتست المنتشر فى وسط ذو توصيل كهربى ضعيف واسموزية عالية كالمانيتول. ويتم تعقيم الحجرة بتيار من الكحول لمدة ١٠ دقائق قبل غسلها بعناية بواسطة الماء المقطر المعقم. ويتم توفير فرق جهد كهربائى متغير بين طرفى الحجرة باستعمال قطبين من البلاتين المسافة بينهما ٢٠٠ ميكروميتر. بعد وضع البروتوبلاست بين القطبين يتم توليد فرق جهد عالى تردده (٠.٥ و ١.٥ ميجاهرتز) وبفرق جهد ١٠-٢٠٠ فولت /سم^{٢}. وبذلك يصبح الغشاء مشحون بشحنات كهربائية وتنجذب الأغشية ذات الشحنات المختلفة إلى بعضها البعض وتصبح موجودة فى شكل حبات العقد. وبمجرد الحصول على هذه الحالة يتم استحداث نبضة أو اثنتين (١٠-٢٠ ثانية) من تيار ثابت وبفرق جهد عالى (١٢٥.٠-١ كيلوفولت/سم^{٢}) حيث يسبب ذلك إلى خلل فى تركيب الغشاء وإحداث ثقوب به تمكن من دمج البرتوبلاستين معا. ويمكن رفع معدل الدمج إلى ٦٠% (Lindsey & Jones, 1990) بمعاملة البروتوبلاست قبل الدمج بمحلول كلوريد الكالسيوم ومنظم النمو spermine.

وأخيراً بقى القول أن الدمج بتلك الطريقة أكثر نجاحاً مع البروتوبلاست المعزول من خلايا تحتوى على الكلوروبلاست دون ذلك الذى مصدره الكالس أو الجذور. ورغم كل ماسبق فإن الدمج باستعمال الطريقة الكيميائية ما زال واسع الاستعمال. وللمزيد حول هذه التقنية راجع Bhojwani & Razdan (1996).

انتخاب الهجن الجسدية

بفرض وضع نوعين مختلفين من البروتوبلاست فى الظروف المثلى للدمج فإن ناتج العملية سيكون الدمج بين نفس البروتوبلاست،النوعين المختلفين من البروتوبلاست وقد يتم الدمج بين واحد أو أكثر من البروتوبلاست الموجود، وبعض البروتوبلاست غير المندمج. وتعتمد عملية إنتاج الهجين الجسدى فى أصلها على وجود النواتين المختلفتين وهو ما يعرف بـ heterokaryons عقب دمج البروتوبلاست ولا يتعدى معدل ذلك ٠.٥- ١٠ %، والأكثر من ذلك فإن نسبة بسيطة من هذا الناتج يتم فيه اندماج النواتين للحصول على هجين فريد فى نوعه، قد يعيقها العديد من التعقيدات التى تلى الاندماج الناجح. وتعتبر عملية انتخابالهجين الجسدى الثنائى Binary fusion فى غاية الصعوبة، حيث يصعب استعمال الانتخاب لبعض الطفرات والمضادات الحيوية وهى الطريقة الشائعة فى زراعة الخلايا الحيوانية. وعلى الرغم من ذلك استعملت بعض الطفرات مثل الالبينو فى الانتخاب على مستوى النبات بعد التكشف وبذلك تتجنب عملية الانتخاب فى مرحلة البروتوبلاست.

ويعتبر الانتخاب اليدوى هو الأكثر استخداماً والذى يعتمد على احتواء كل نوع من البروتوبلاست على صفة مميزة مثل الكلوروبلاست أو حبات النشا والتى يمكن تميزها بسهولة باستعمال المجهر. ويمكن تحقيق ذلك باستعمال بروتوبلاست معزول من أوراق أو بتلات أحد الآباء، وبرتوبلاست الأب الآخر والذى يتم الحصول عليه من المعلق الخلوى أو من أجزاء غير ملونه كدرنات البطاطس (Razdan, 2002).

والحصول على بروتوبلاست به وفرة من حبات النشا يتم تنمية المعلق الخلوى فى بيئة غنية فى الكربوهيدرات. بذلك يمكن تحديد ناتج البروتوبلاست المندمج المحتوى على الصنفين المعروفين سابقاً. بعد ذلك يتم عزل البروتوبلاست المندمج باستعمال ماصة أو بعض الأجهزة الحديثة التى تعتمد على قياس الطيف الضوئى. وبالرغم من أن هذه الطريقة تستغرق وقتاً طويلاً إلا أنها تمتاز باستبعاد ناتج الدمج إذا كان يحتوى على أكثر من بروتوبلاستين. وإذا تم نجاح دمج أنويه الأبوين فإن الناتج يطلق عليه somatic hybrid وبعد انتخاب البروتوبلاست المندمج والنجاح فى دفعه للتكشف وتكوين نباتات لابد من التأكد من توريث صفات الأبوين للنسل ويتم ذلك بعدة طرق منها:

١. وجود صفات مورفولوجية وسطية بين كلا الأبوين مثل ارتفاع النبات، شكل أو حجم الأوراق أو لون الأزهار. لكن لا يعول كثيراً على هذه الصفات حيث أنها تتأثر بالبيئة وبظروف الزراعة المعملية أيضاً وبدرجة الفعل الجينى المتحكم فى الصفة.
٢. إذا كانت كروموسومات الأبوين مختلفة من حيث الشكل المورفولوجى فيمكن تمييز الهجين عن طريق الفحص السيتولوجى Karyotype analysis، لكنها عملية صعبة. ويوضح جدول رقم (٦-٢٦) أعداد الكروموسومات فى بعض الهجن الجسدية. ومن الجدول يلاحظ أن النباتات الناتجة من الدمج بها تباين كبير فى أعداد الكروموسومات وغالباً ما تحتوى على عدد من الكروموسومات أكبر من العدد الكلى للأبوين. يرجع ذلكلحدوث دمج لأكثر من بروتوبلاست خليتين معا والذى قد يتبعه عدم اتزان فى الانقسام الخلوى، أو بسبب الاختلاف فى سرعة تضاعف الـ DNA للأبوين بعد الدمج، بالإضافة إلى تأثير زراعة الأنسجة نفسه على حدوث تباين وراثى.
٣. أما الطريقة الأكثر دقة فهى التحليل الإنزيمى Isoenzyme analysis وأساس هذه الطريقة أن للإنزيم تتابع محدد من الأحماض الأمينية. ويكون هناك فرق ضئيل جداً بين الآباء فى هذا التتابع لكنه كاف لإظهار الفرق بينهم، ويتغير سلوك البروتين أثناء هجرته عند تعرضه لفرق جهد كهربائى electrophoresis حيث يتم الحصول على حزم مختلفة بعد الصبغ بالصبغات الخاصة المميزة لكل انزيم. وقد يحتوى الهجين على حزم جديدة لم تكن موجودة فى أى من الأبوين. ومن

الإنزيمات التى تستعمل غالباً لتحديد التهجين esterase و peroxidase و alchol dehydrogenase. لكن تبدو مشكلة الاعتماد على هذه الطريقة فى اختلاف تركيب الإنزيم باختلاف النسيج واختلاف مرحلة تطور النبات نفسها.

٤. الاعتماد على وجود مركبات ثانوية مميزة لأب معين.

٥. وجود ظاهرة قوة الهجين heterosis فعلى سبيل المثال عند نجاح التهجين الجسدى بين *Datura innoxia* المميزة بعدم وجود الكلوروفيل و *D. sanguinea* المميزة بوجود الكلوروفيل يلاحظ أن النسل يمتاز بقوة النمو حتى على مستوى الخلايا.

٦. أما الطرق الأكثر دقة فهى المعتمدة على التقنيات الجزنية Molecular techniques والتى تسمى تهجين DNA hybridization technique.

جدول٦-٢٦: أعداد الكروموسومات فى بعض الهجن الناتجة عن دمج البروتوبلاست (Chawla, 2000).

النوعان الداخلان فى التهجين وعدد كروموسومات بهما	عدد كروموسومات الهجين
Brassica olerace (2n=18) X*B.* campestris (2n= 18)	تباين واسع
B. napus (2n= 38) X *B. juncea* (2n= 36)	تباين واسع
Datura innoxia (2n= 48) X *D. stramonium* (2n= 24)	٤٦، ٤٨، ٧٢
Nicotiqnq. tobacum (2n= 48) X *N. glutinosa* (2n= 24)	٥٠- ٥٨
N. tobacum (2n= 48) X *N. nesophila* (2n= 24)	٩٦
N. tobacum (2n= 48) X *N. sylvestris* (2n= 24)	٧٢
Lycropersicon esculentum (2n= 24) X *L. peruvianum* (2n= 24)	٧٢
Petunia parodii (2n= 48) X *P. hyprida* (2n= 14)	٤٤-٤٨
Solanum tuberosum (2n= 24,48) X *S. chacoense* (2n= 14)	٦٠

الفصل السابع

التغييرات المظهرية والوراثية فى مزارع الأنسجة

تتوقف الصفات المظهرية للكائن الحى والتى تعرف بالطرز المظهرى Phenotype بصورة أساسية على التركيب الوراثى Genotype أى الطرز الوراثى لهذا الكائن، وكذلك العوامل البيئية. لكن لا يتوقف الأمر عند هذا الحد بل من المعروف أن هناك تفاعل واضح بين التركيب الوراثى والظروف البيئية المختلفة المحيطة بالكائن. ويؤدى التفاعل بين العوامل الوراثية والبيئية فى النهاية إلى ظهور طرز مظهرية متباينة فى الكائن. ويطلق على السلسلة المعقدة من عمليات التطور اللازمة لتحويل الصفة الوراثية إلى صفة مظهرية Epigenotype . وقد أطلق على النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة فى بداية الأمر true-to-type بمعنى أن النباتات مطابقة تماماً للنبات الأم.

لكن فى السبعينيات والثمانينيات من القرن الماضى لاحظ البعض وجود تباين بين النباتات المستولدة فى مزارع الأنسجة، وكذلك بينها وبين النبات الأم. وعندها استهل الكثير من العلماء دراسة هذا الأمر والتفكير فى استغلاله بطريقة إيجابية. فمن وجهة رأى علماء النبات يعتبر هذا التباين الطريقة السهلة لدراسة النواحى الوراثية للخلية الجسدية. ويجب هنا أن يتم التفريق بين variant والذى يعنى أى تغير فى الطرز المظهرى بصرف النظر عن سببه وفى الغالب لا يتم توريثه بطريقة مندلية و mutation والتى تعنى تغيير ثابت فى التركيب الوراثى للفرد والذى قد يستوضح من الشكل المظهرى، وقد لا يعبر الشكل المظهرى عنه فى بعض الحالات كبعض الطفرات الموضعية. ولعل من أهم صفات الطفرة انتقالها للنسل بالتكاثر الجنسى، وكذلك وجود بعض الدلائل الجزيئية المرتبطة بها (Jayasankar, 2005).

ولقد طورت العديد من الاستراتيجيات للتحقق من وجود التباين فى النباتات المستولدة اعتمادا على الصفات المظهرية والتحليل السيتولوجى لفحص عدد الكروموسومات وكذلك تركيبها، بالإضافة إلى المشابهات الإنزيمية. وحديثاً تستعمل الطرق المعتمدة على الإحيائية الجزنية مثل Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) و amplified fragment length polymorphism (AFLP) و Restriction fragment length polymorphism (RFLP).

وكانت أول ملاحظة تاريخية لوجود تباين فى بعض الصفات الكمية لنباتات قصب السكر الناتجة من زراعة الأنسجة فى سنة ١٩٦٩ على الرغم من تمتع تلك الصفات بدرجة كبيرة من الثبات الوراثى. وقد لاحظ Heinz & Mee (1971) وجود تغييرات كبيرة فى عدد الكروموسومات متوافقة مع حدوث اختلافات مظهرية وإنزيمية فى النباتات الناتجة من زراعة الخلايا. وقد أظهرت بعض النباتات المتكشفة معدل أكبر من التفريع والاستطالة مع معدل بطئ من النمو. كما سجلت فى السبعينيات من القرن الماضى اختلافات فى النباتات المستولدة من نباتات الراى rey تضمنت نباتات خالية من الكلوروفيل albino وتباين فى شكل الأوراق وقوة النمو وأيضاً تلازمت تلك الاختلافات مع تباين فى عدد الكروموسومات. وفى سنه ١٩٧٦ اقترح Skirvin & Janick إمكانية استخدام هذا التباين فى النباتات المستولدة فى التحسين الوراثى للحاصلات البستانية.

وكان Larkin & Scowcroft (1981) أول من أطلق مصطلح somaclonal variation على التباين الموجود فى النباتات المستولدة من الأنواع المختلفة من زراعة الأنسجة سواء المستخدم فيها أجزاء نباتية جسدية أو جنسية، وإن كان البعض يستخدم مصطلح gametoclone لوصف التباين الموجود فى النباتات المستولدة من الأنسجة الجنسية. وباختصار تقود زراعة الأنسجة معملياً إلى إظهار تباين كان موجود أصلاً فى الأجزاء النباتية التى استعملت فى الإكثار أو استحداث تغييرات وراثية أو مظهرية لم

تكن موجودة أصلاً بالنبات الأم. والجدير بالذكر أن نسبة عالية من هذه التغييرات تحدث تلقائياً وبدون تدخل خارجي، كما أنه من الصعب توجيهها لتأخذ مساراً محدداً بعينه. ويعد هذا أحد عيوب الاعتماد على هذا التباين فى التحسين النباتى. ولا تقتصر التغييرات الوراثية الحادثة أثناء الإكثار الخضرى على مزارع الأنسجة بل تحدث فى الطبيعة أثناء الإكثار التقليدى صوراً مشابه من التباين، فمثلاً وجدت بعض النباتات المتضاعفة الثلاثية بين النباتات الناتجة من إكثار *Saintpaulia ionanth* أو *Begonia* x *hiemalis* عن طريق تكوين براعم عرضية على الأوراق (Mohan, 1997).

ويقسم التباين الحادث فى زراعة الأنسجة إلى نوعين، الأول الوراثى genotype variation وهو تغير ثابت ودائم فى المادة الوراثية ويتم توريثه إلى النسل الناتج بالتكاثر الجنسى. وينشأ ذلك النوع من التباين نتيجة لحدوث طفرات فى المادة الوراثية ويتبع توريثه من جيل لآخر القواعد الوراثية المعروفة. وهذا النوع من التغيرات يكون مفيد عن طريق إكثار النباتات المنتخبة من الزراعة المعملية وتسويقها تجارياً سواء عن طريق البذور أو بالإكثار الخضرى. لكن ليس من السهل دوما عَزل الطفرة المفيدة الناتجة من زراعة الأنسجة خاصة إذا كانت الطفرة المرغوبة متنحية. كذلك فإن تعبير بعض الطفرات فى النسل الناتج يرتبط بالظروف البيئة المحيطة. ويتطلب التعرف على الطفرات الدقيقة micromutations بعض الطرق الخلوية الدقيقة والتقنيات الأخرى.

ويشير Bhojwani & Razdan (1996) إلى أن أغلب التغييرات الوراثية الثابتة فى النباتات المستولدة فى مزارع الأنسجة تقع فى المادة الوراثية فى النواة لكن لا يمنع ذلك حدوث بعضها فى المادة الوراثية السيتوبلازمية. أما النوع الآخر من التغييرات فيعرف بالتباين المظهرى أو البيئى phenotypic or environmental variation وهو تغير غير ثابت ويحدث غالباً نتيجة تغير فى الظروف البيئية ولا يتم توريثه للنسل الناتج

بالتكاثر الجنسى. هذه التغييرات الوراثية المظهرية قد تكون نتيجة تغير مؤقت فى الظروف البيئية أو تغيير مؤقت فى العوامل الوراثية حيث تؤدى بعض الظروف البيئية كمنظمات النمو أو الظروف التى كان ينمو فيها النبات قبل استعماله كمصدر للتكاثر إلى تنشيط بعض العوامل الوراثية - التى تكون فى العادة غير نشطة- للتعبير عن نفسها ويطلق على هذه الظاهرة التباين المؤقت وتسمى Epigenetic. وفى كثير من الحالات يمكن استثمار تلك التغييرات المؤقتة على أساس أن النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة هى منتج نهائى، فعلى سبيل المثال يلاحظ زيادة كبيرة فى معدل تفريع بعض نباتات الزينة عقب إكثارها معملياً، وعليه تباع هذه النباتات فى هذه الصورة الجذابة (George, 1993).

وعموماً تحدث التغييرات الثابتة أو العكسية بنسب متباينة لكن غالباً تكون عالية فى بعض أنواع مزارع الأنسجة، فالتكشف غير المباشر يؤدى إلى حدوث معدل أعلى من التباين بالمقارنة مع المباشر. وعلى هذا فإنه يتطلب استخدام أنسجة وطرق زراعة تقلل بقدر الإمكان من تلك التغييرات إذا لم يكن الغرض من الإكثار الدقيق إحداثها لاستخدامها فى برامج التربية. وعلى الرغم من أهمية إنتاج نباتات مطابقة للصنف فى برامج الإكثار التجارى فإنه قد يسمح بمعدل تباين منخفض نسبياً يتراوح بين ٣ و ٥%، وربما يرتفع إلى ١٠% على سبيل المثال فى الإكثار التجارى للموز والذى يمكن تمييز ٦-٣٨% من النسل الناتج فى مزارع الأنسجة بتغييرات مظهرية (Sahijram *et al.*, 2003).

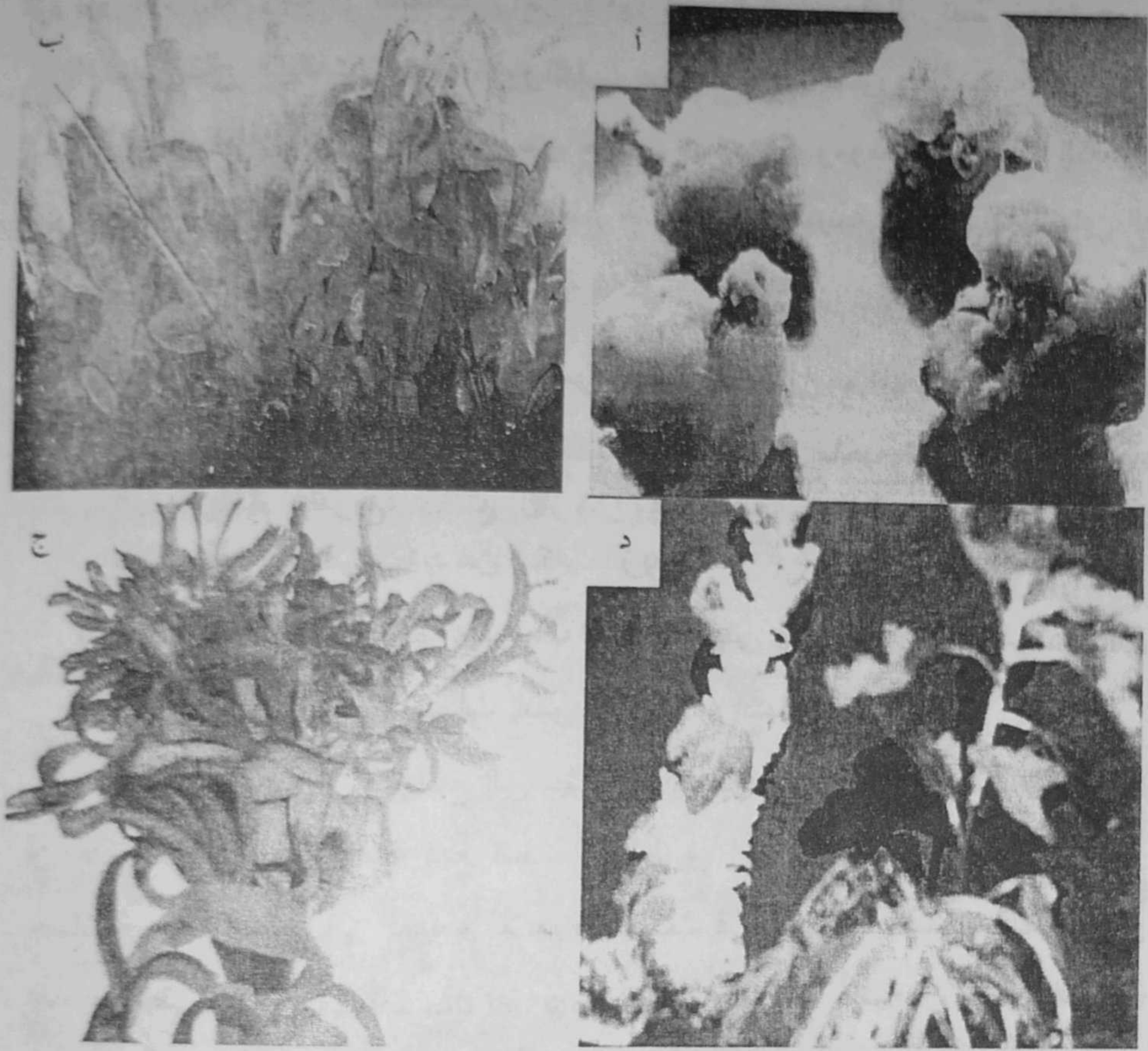
ومن المعروف أن طرق الإكثار التى ينتج منها عدداً كبيراً من النباتات تؤدى إلى حدوث نسبة عالية من التباين. ولذا ينصح بإعادة تكوين المزرعة من جديد بدءاً من النبات الأم بدلاً من استمرار تقسيم ونقل المزرعة المتكونة للحد من هذا التباين. ويضيف Kaeppler *et al.* (2000) أن آليات حدوث التغييرات الثابتة أو المؤقتة تسبب انخفاض

قوة نمو المزرعة ومعدل التكشف. ولعل تدهور صحة المزرعة المرتبط بزيادة عمرها عائقاً أمام إنتاج النباتات المحورة وراثياً. وعموماً تتعدد صور الاختلافات الوراثية الحادثة فى زراعة الأنسجة حيث تتضمن حالات التعدد الكروموسومى وكذلك التغييرات الكروموسومية التركيبية بالإضافة إلى الطفرات العاملية الجينية. ومن أمثلة التباين الذى سجل فى أنواع مختلفة من زراعة الأنسجة (شكل رقم ٧-١).

١. التباين فى حجم الخلايا، سرعة النمو، اللون محتوى الخلايا من المواد الثانوية.
٢. التباين فى الصفات الظاهرية للنباتات المستولدة من ناحية شكل الأوراق، طبيعة النمو، نظام التفريع، وضع الأزهار على النبات، وكثير من هذه التغييرات مرغوبة خاصة فى العديد من نباتات الزينة.
٣. التباين فى المقاومة لبعض ظروف الإجهاد البيئى abiotic أو الإحيائى biotic.
٤. التباين فى الاحتياج لمنظمات النمو بعد عدة مرات من الزراعة.

وتشير كثير من المراجع إلى عشوائية التغييرات فى مزارع الأنسجة. لكن يبدو أن هذه الفرضية غير دقيقة فمع استعمال الطرق الجزيئية الحديثة أمكن التحقق من حساسية مواقع محددة فى الجينوم للإجهاد الحادث فى مزارع الأنسجة بدءاً من مرحلة التأسيس حتى الأقلمة (Thomas *et al.*, 2002) . وعموماً يتضح أن التباين الحادث فى زراعة الأنسجة أصبح أداة فعالة فى أيدى مربى النبات لاستخدامها فى تحقيق الكثير من أهداف برامج التربية.

وقد أوضح (2001) Jain و (2001) Predieri العديد من الأمثلة لنباتات أمكن إنتاج أصناف تجارية منها بتحسين صفاتها المحصولية أو المقاومة لبعض الأمراض أو الحشرات أو الإجهاد البيئى بالاعتماد على somaclonal variations بصورة أساسية أو بالدمج بينها وبين بعض المطفرات سواء الكيميائية أو الطبيعية، وبهذا يمكن القول أن علم زراعة الأنسجة والهندسة الوراثية من أحدث العلوم التى يرتكز عليها علم تربية النبات.



شكل ٧-١: التباين فى الكالس الناتج من نفس الجزء النباتى فى *Ziziphus mauritiana* (أ)، ونباتات قرنفل خالية من الكلوروفيل (ب)، وزيادة عالية فى تفريع القرنفل أعلى الساق مع نمو طبيعى لبعض النباتات فى نفس المزرعة (ج)، ونباتات التين وقد غطتها زوائد شمعية بيضاء مع ضعف النمو وفى نفس المزرعة نباتات عادية (د).

ويمكن توضيح مميزات وعيوب somaclonal variation فى تربية النبات في الجدول التالي:

العيوب	المميزات
ربما لا يستفاد منها فى الصفات الصفات الكمية	قد يحدث التباين فى بعض الصفات المحصولية
حدوث تغيرات عكسية لبعض الصفات	يحدث التباين بمعدل عالي
التباين الحادث عشوائى وغير موجه	قد يكون التباين فريداً ولا يمكن الحصول عليه بالطرق التقليدية
عدم الثبات الوراثى أحيانا	انتخابنباتات متحملة للإجهاد البيئى والبيولوجى
ضرورة إجراء تقييم حقلى دقيق	تقصير برنامج التربية

أولاً: التباين المؤقت Epigenetic

من المعروف أن جميع العمليات الحيوية فى الخلية تتم عبر بروتين تم تخليقه فى السيتوبلازم كترجمة للحامض النووى الرسول mRNA الذى تخلق بدوره عبر نسخ DNA. وقد أمكن فى السنوات الأخيرة التوصل إلى تتابع الحامض النووى للكروماتيدات، وكان السؤال لماذا يلاحظ وجود تباين واضح فى بعض صفات التوائم المتشابهة رغم تركيبهم الوراثى المتطابق. وهذا ما أرجعه العلماء إلى ما يسمى الوراثة الفوقية epigenetic والتى ترجع بدورها إلى ذلك التتابع من الحامض النووى والذى يطلق عليه إن صح التعبير الحامض النووى الخردة "junk DNA" والذى لا يتم نسخه إلا فى حالات قليلة. وهنا لا بد من الإشارة أن جزء بسيط من الحامض النووى فى الكائنات الراقية يتم نسخه وترجمته إلى بروتين، أما باقى التتابعات والتى أطلق عليها junk DNA فقد تراكمت كما يرى البعض عبر عمليات التطور. وللتباين الوراثى فى

مزارع الأنسجة أهمية خاصة فى دراسة epigenetic ودورها فى تنظيم عمل الخلية. وقد تم التأكد بالفعل من دور هذا الجزء من الحامض النووى فى تنظيم عمل الخلية من خلال تحكمها فى نشاط بعض الجينات. ويتضمن ذلك ميثلة الحامض النووى أى إضافة مجموعة ميثيل وإضافة مجموعات الاسيتيل للهستونات"histone acetylation" وغيرها بحيث لا تمس بأى حال تتابع الحامض النووى. والتغيير فى هذا النظام يتم توريثه للنسل لكن حتى الآن هناك نظريات هل هذا جزء من النظام التقليدى لتخليق البروتين من الحامض النووى "DNA/RNA/Protein" أم هو نظام آخر مستقل، وفى الواقع فإن الحديث عن هذا النظام معقد وليس هنا مجال لشرحه، ويمكن الرجوع إلى بعض المراجع المتخصصة.

من المُسلم به احتواء كل خلية من خلايا الكائن الحى على عدد كبير من المعلومات الوراثية التى تتحكم فى صفاته، لكن يلاحظ أن هذه العوامل لا تعبر عن نفسها كل الوقت أو بنفس الدرجة. بمعنى أن هناك عوامل لا تعبر عن نفسها إلا فى مرحلة معينة من العمر أو تحت ظروف بيئية خاصة تعمل على استحثاث هذه العوامل. أى أن الظروف البيئية تؤثر فى تعبير بعض الجينات عن نفسها فيتم نسخها وترجمتها ومن ثم تتخلق بروتينيات جديدة تقود فى النهاية إلى تغيير فى الشكل المظهرى للنبات وبزوال العامل المُستحث inducer يتوقف تعبير هذا العامل الوراثى وتتغير الصفة المظهرية تبعاً لذلك. وقد يتم هذا التوقف سريعاً وبمجرد زوال العامل المُستحث أو يمتد تأثيره بعض الوقت كأن يمتد إلى جيل تالى قبل أن يتم التحول فى الصفة المظهرية. ويسمى هذا النوع من التغير الوراثى الذى يختفى بزوال العامل المُستحث بـ Epigenetic. ومن الأمثلة على ذلك عمليات ميثلة وتضاعف amplification الحامض النووى فى مزارع المعلق الخلوى لخلايا الجزر، فأثناء الطور اللوغارتمى يقل معدل التكبير وتزيد الميثلة. وربما يشير ذلك إلى حدوث إعادة فى ترتيب عوامل epigenetic ويمكن القول بأن هذا مصاحب لتكوين الكالس من المُستأصَل النباتى. أما أثناء طور الثبات وهو المصاحب

لتكوين الجذور فيلاحظ زيادة فى معدل التضاعف وانخفاض معدل الميثلة. ويمكن باستعمال منظمات النمو خاصة الأوكسينات استحثاث عمليات الميثلة (Loschiavo *et al.*, 1989) و(Arnholdt-Schmitt, 1993) .

وربما يحدث خلل أثناء إعادة الترتيب بسبب epigenetic حيث يظهر جلياً فى صورة somaclonal variations. ولا بد من التأكيد على أن هذا النوع من التغييرات لا ينتج عنه أى تغيير فى تتابع الحامض النووى أو التغييرات الكروموسومية المعروفة (2000) Kaeppler *et al.* وبالطبع فإن التغييرات الوراثية الثابتة والتى يتم نقلها بالإكثار الجنسى تكون ذات الأهمية الأكبر فى برامج تربية النبات على العكس من التغييرات المؤقتة. لكن يصعب فى معظم الأحيان الفصل بين النوعين دون إجراء تلقيح ذاتى للنباتات الناتجة (لكن ربما تكون هذه النباتات عقيمة) ودراسة توريث الصفة فى النسل الناتج. ومن أمثلة هذا النوع من التباين فى مزارع الأنسجة ما يلى:

١. النباتات الناتجة من زراعة القمم الميرستيمية أو من تكوين البراعم العرضية للحصول على نباتات خالية من الفيروس. حيث تختلف تلك النباتات فى مظهرها الخارجى عن النباتات الأم المصابة بالفيروس.

٢. قد يسبب استعمال بعض المركبات مثل السيتوكينينات تغيير الصفات المظهرية كسُمك الأفرع، ونظام التفريع، وغيرها من الصفات.

٣. تعمل الظروف المعملية من ارتفاع الرطوبة وانخفاض الإضاءة ونوعيتها على استحداث تغييرات فى الشكل الظاهرى للأوراق، وآلية عمل الثغور. وكذلك التغير الظاهرى فى الأفرع المنزرعة أو النباتات المستولدة نتيجة ظاهرة التميؤ الزجاجى.

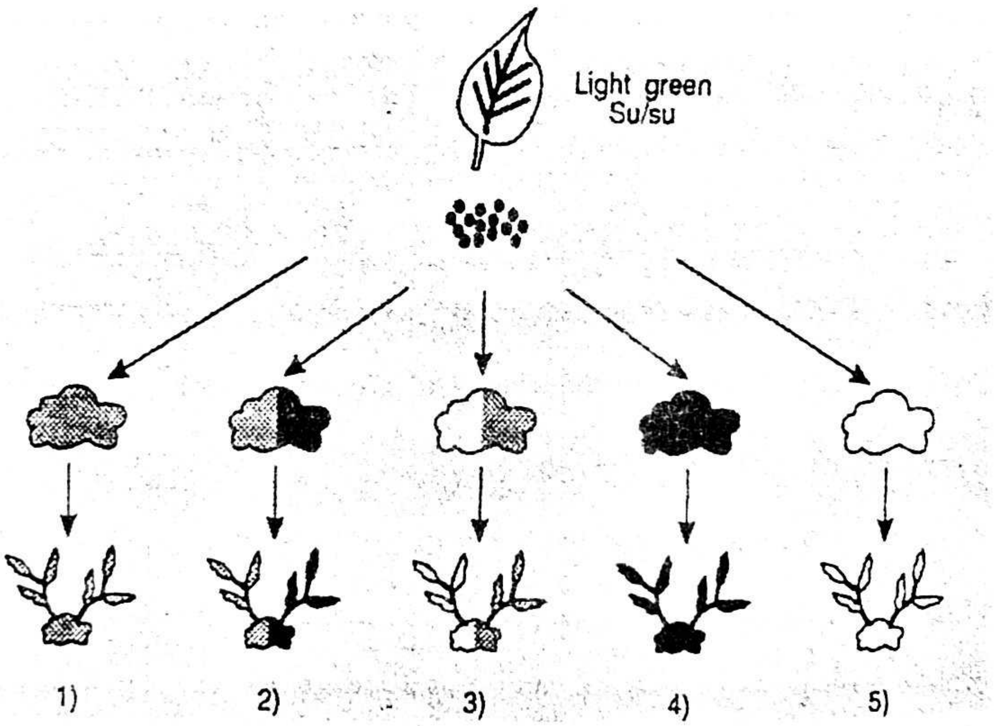
ثانياً: التغييرات الوراثية المورثة Mutations

يقال أن الخلية بها طفرة عند حدوث تغيير فجائى فى الجينوم بشرط توريث هذا التغير للنسل. ويسهل ملاحظة هذا الخلل فى النباتات الثنائية كالذرة على العكس من النباتات متعددة المجموعات الكروموسومية كالقمح فربما لاتسبب الطفرة تغيرفى الشكل

المظهرى. فعلى سبيل المثال وجد (Lee & Phillips, 1987) أن كل نبات ذرة ناتج من مزرعة عمرها ٨ شهور يحتوى على معدل ١.٢٣ طفرة فى صفات وصفية أى تسبب تغيير ثابت فى الطرز المظهرى انتقل لعدة أجيال من النسل بالتكاثر الجنسى. وقد سجلت العديد من التغييرات الوصفية فى كثير من الصفات مثل طول النباتات والكتلة الحيوية ومحصول الحبوب وغيرها. وبالدراسة الوراثية لعديد من النباتات فى مزارع الأنسجة تبين وجود بعض الطفرات التى تمس العديد من الصفات الكمية أيضاً (Kaeppler*et al.*, 2000). وربما تحدث الطفرة نتيجة تغير بسيط فى موضع أو تركيب جين واحد أو أكثر. وقد تكون هذه التغييرات فى العدد أو التركيب الكروموسومى مسببة صور عديدة من الاختلافات الوراثية. وتحدث التغييرات الوراثية بصورة طبيعية فى كثير من الكائنات لكن بمعدل بسيط. لكن يؤدى الإكثار المعملى -كما سبق الذكر- إلى زيادة معدل حدوث أو ظهور هذه التغييرات زيادة كبيرة جداً، أو على الأقل زيادة فرصة ظهورها. ويرجع ذلك للأعداد الهائلة من الخلايا الموجودة فعلى سبيل المثال تحتوى كل ١٠٠ مل من معلق خلايا الدخان على ١ X $١٠^{٧}$ خلية (George, 1993). وعلى الرغم من المعدل العالى لحدوث تلك التغييرات فى مزارع الأنسجة فإن العديد منها لا يتم ملاحظتها فى النُبيتات الناتجة، إما لأن هذه الطفرات تكون مميتة أو لأنها تمنع تكشف الخلية المحتوية عليها أو تؤدى إلى ضعف النمو الخضرى للنبات المتكشف بمعنى أن لها شكل ظاهرى معاكس فى النمو وبذلك تستبعد من العشيرة.

وفى المقابل فإن بعض التغييرات الحادثة أثناء زراعة الأنسجة مفيدة وهامة بالنسبة لمربى النبات بطريقة مباشرة أو غير مباشرة. فقد يكون التركيب الوراثى المستحدث مهماً كسلالة خلوية Cell line لإنتاج مادة ثانوية كالقلويدات أو الجليكوسيدات معمليا أو لإجراء التحويل الحيوى لبعض المركبات الأولية إلى مواد ثانوية وهى المواد ذات الاستخدام الطبى أو الصناعى. والتغييرات فى الشكل الظاهرى للنباتات المستولدة شائعة الحدوث ليس فقط فى حالة التكشف غير المباشر من الكالس والمعلق الخلوى بل

فى التكشف المباشر ومزارع البروتوبلاست أيضاً. وتشير النتائج التى لوحظت فى نباتات الدخان المتكشفة باستخدام مزارع البروتوبلاست من أوراق نباتات لونها أخضر مصفر تركيبه الوراثى خليط Su/su حيث أن الطراز su/su لونه أخضر داكن أما الطراز Su/Su البينو إلى حدوث تغيرات وراثية أثناء عزل وزراعة البروتوبلاست. ويوضح Lorz & Scowcroft (1983) فى الشكل رقم (٧-٢) الحصول على كالسات تكشفت منها نباتات خضراء مصفرة، خضراء داكنة، بيضاء، نباتات خضراء داكنة + خضراء مصفرة، نباتات خضراء مصفرة + البينو.



شكل ٧-٢: يوضح تكشف نباتات متباينة وراثياً من كالسات مصدرها بروتوبلاست خلايا أوراق الدخان ذو التركيب الوراثى Su/su حيث تم الحصول على خمسة طرز من الكالسات هى: (1 Su/su, 2) Su/su + su/su, 3) Su/Su + Su/su, 4) su/su and 5) Su/Su .(Lorz & Scowcroft, 1983)

مصدر التغييرات الوراثية فى زراعة الأنسجة

قد يرجع التباين الحادث فى زراعة الأنسجة جزئياً أو كلياً إلى التغييرات الموجودة فى النبات الأم مصدر الخلايا أو الأجزاء النباتية المستخدمة فى الزراعة.

تحتوى خلايا بعض النباتات خاصة تلك التى تعرف بـ polysomatic على طرز وراثية متباينة وذلك على الرغم من التشابه المظهرى فيها، وتكثر هذه الظاهرة فى بعض النباتات كالدخان والشعير (Jayasankar, 2005). وقد حدث جدل حول ما إذا كان هذا النوع من التضاعف نتيجة أم سبب للتكشف، ويخلص Bhojwani & Razdan (1996) إلى أن هذا التضاعف يمنع الخلية التى سلكت مسلك التكشف من الانقسام مرة أخرى تحت الظروف الطبيعية. وربما تحتوى بعض خلايا النبات الأم على طفرات لكن لا تكون واضحة فى الشكل الظاهرى. فعلى سبيل المثال قد تكون إحدى خلايا الورقة محتوية على طفرة فى أحد الجينات المسئول عن تكوين اللون فى الأزهار، أو تكون أحد خلايا عنق الورقة المستعملة كمصدر للمستأصل المنزرع بها تضاعف كروموسومى.

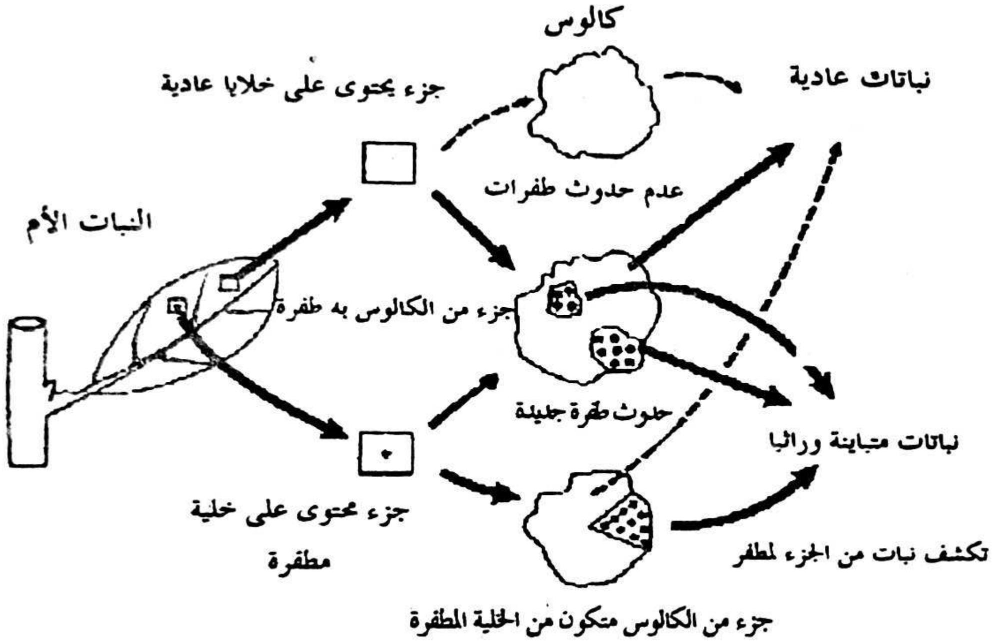
وفى الغالب لا تلاحظ تلك الاختلافات فى الظروف الطبيعية لكن إذا قدر لهذه الخلية أن تتكشف إلى نبات أو على الأقل المشاركة فى تكوين النبات المتكشف فإن هذه الطفرة ستتضح فى الشكل الظاهرى للنبات المستولد. وأمكن بالفعل إنتاج أصناف جديدة من نباتات الازاليا بزراعة الأجزاء الملونة من بتلات أحد الأصناف ويرجع ذلك لكون الجزء الملون وعلى العكس من باقى البتلة به تضاعف كروموسومى (De Schepper *et al.*, 2004) لكن الكثير من التغييرات الحادثة فى النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة تكون مستحدثة أى غير موجودة بالنبات الأم. وتحدث معظمها فى المراحل الثلاث الأساسية من زراعة الأنسجة. فقد يكون ذلك أثناء مرحلة تأسيس المزرعة وغالباً ما يتضح ذلك فى عزل البروتوبلاست دون غيره من أنواع زراعة الأنسجة، أو أثناء مرحلتى النمو والإستيلاد، وتحدث كثير من هذه التغييرات فى هاتين المرحلتين حيث يحدث انقسام سريع جداً فى الخلايا بالمقارنة بالمعدل العادى من الانقسام. ويمكن توضيح مصدر التباين فى زراعة الأنسجة إلى ما يلى:

١. التغييرات الراجعة إلى النبات الأم

يقدر Neumann*et al.*, (2009) متوسط عدد الخلايا بالمُستأصَل النباتى بين ١٠,٠٠٠ إلى ١٥,٠٠٠ خلية أو أكثر. وربما يفترض تشابه التركيب الوراثى لجميع خلايا النسيج لكن من الثابت الآن وجود مجموعة من الخلايا الخضرية ذات تركيب وراثى مختلف فى نفس النسيج، وتتعاون كلا المجموعتين فى تكوين أنسجة النبات والقيام بالوظائف المختلفة. ويشير D'Amato (1980) أن حوالى ٩٠ % من النباتات الطبيعية مغطاة البذور تحتوى على تغييرات وراثية فى خلاياها. وعلى هذا فإن معظم الخلايا فى الأنسجة البالغة كخلايا النخاع والبشرة وغيرها تظهر مستويات مختلفة من التغييرات الوراثية. وعلى العكس من ذلك فإن الخلايا فى القمم الميرستيمية تقع تحت نظام تحكم عالى يضمن الثبات الوراثى بدرجة عالية لكن أثناء التكشف يحدث هذا الخلل فى بعض الخلايا، وربما يصل التضاعف الكروموسومى فى بعض الحالات إلى ثمان مرات. وقد يتدرج ذلك التباين من تغير بسيط غير ملحوظ كتغير فى بعض الصفات الفسيولوجية فى الخلايا المشتركة فى تكوين النسيج إلى تغير مورفولوجى واضح من اتحاد خلايا من نوعين مختلفين وهو ما يعرف بالكيميرا. وبفرض أنه تم استعمال نسيج به كيميرا للإكثار الدقيق فمن المتوقع أن تكون النباتات المستولدة منه متباينة على أساس التباين الموجود فى الخلايا التى تكشفت منها كما يتضح من شكل رقم (٧-٣). فربما تتكشف النباتات من نسيج واحد فقط من أو من النسيجيين معاً.

كذلك الأمر فإن معدل التباين يكون عالى عند استعمال أنسجة بالغة متكشفة كمصدر للجزء المنزرع لأن بعض الخلايا المتكشفة والتى لها وظائف محددة يكون بها صور من التغييرات الكروموسومية العددية. حيث يحدث تضاعف فى هذه الخلايا دون انقسام النواة أو تنقسم النواة لكن لا يحدث انقسام للسيتوبلازم ولا يتكون الجدار الخلوى وهو ما يعرف بالتضاعف الداخلى Endoreduplication. وتعرف الخلايا التى بها صور مختلفة من التضاعف الكروموسومى فى الأنسجة الجسدية Polysomaty or

Polysomatine. ويكثر وجود هذه الصور من التضاعف فى الأنواع النباتية المتضاعفة مثل الأرز والدخان والبطاطس. وقد تحتوى الخلية أيضاً على عدد أقل من الكروموسومات بالمقارنة بالخلية العادية (التعدد الكروموسومى غير التام). ويعتبر الإكثار عن طريق مزارع البروتوبلاست أو الأجنة الجسدية طريقة فعالة للحد من التباين



شكل ٧-٣: مصادر التباين الوراثى فى النباتات المتكشفة من زراعة الأنسجة(George, 1993).

بين النباتات الناتجة من مزارع الأنسجة حيث يتكون النبات من خلية واحدة فيكون تركيبه الوراثى واحد (Neumann*et al.*, 2009).

ومن الواضح أن من أسباب الخلل الكروموسومى الحادث أثناء الانقسام الميتوزى هو فشل خيوط المغزل فى التكون أو وجودها فى أكثر من قطبين فى الخلية. أو قد يحدث ذلك الخلل فى عدد الكروموسومات نتيجة توقف الخلية عن الانقسام فى طور G2 ثم دخول الخلية فى مرحلة G1 دون إتمام الانقسام الميتوزى العادى. وأحيانا يتلازم التكشف مع حدوث خلل فى عملية الانقسام كحدوث أكثر من انقسام للسيتوبلازم أثناء انقسام الخلية. كما قد يحدث تضاعف للكروماتيدات أثناء الطور S من الانقسام الخلوى

دون حدوث انفصال لهذه الكروماتيدات. هذه الصور غير الطبيعية من الانقسام الخلوى غير شائعة الحدوث فى الخلايا الميرستيمية والأنسجة المشتركة فى الإكثار الجنسى، وذلك لميكانيكية عمل الخلية المحكمة فى الظروف الطبيعية للمحافظة على ثبات تركيبها الوراثى. وإذا تم استعمال نسيج به خلايا تحتوى على إحدى هذه الصور من الخلل الكروموسومى فيتوقع أن تحتوى الخلايا الناتجة بالانقسام وبالتالى النُبيتات المستولدة من هذا النسيج على نفس الاختلافات الموجودة فى النبات الأم بالإضافة إلى صور جديدة لم تكن موجودة فى النبات الأم. ويمكن التعرف على هذه الاختلافات بمقارنة هذه النباتات مع الأم (راجع دورة الخلية بالفصل الأول).

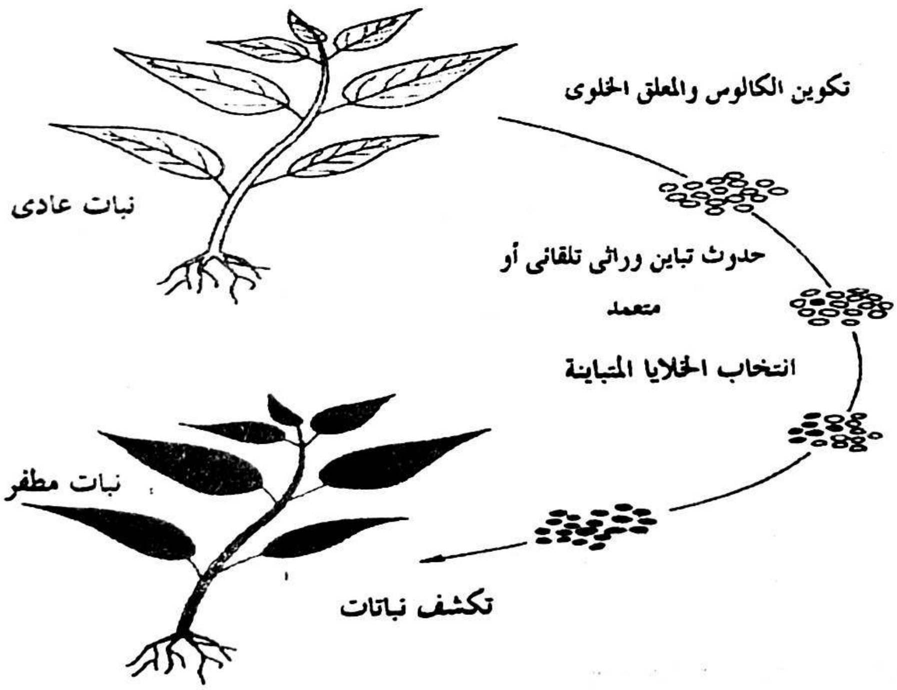
٢. التغييرات الراجعة إلى الجزء المنزرع

تحتوى بعض أجزاء النبات البالغ على خلايا بها صوراً من الطفرات الموضعية أو التضاعف الكروموسومى بنسب متباينة فى الأنسجة المختلفة كما سبق ذكره. لكن يجب التنويه هنا إلى أن بعض الأنسجة تكون أكثر عرضة لحدوث اختلافات فى العدد الكروموسومى دون غيرها. وتزيد نسبة هذه التغييرات فى الأنسجة غير الميرستيمية أو غير الجنينية. ومن ثم يلاحظ أن أكثر أنواع الكالس ثباتاً من الناحية الوراثية هو الناتج من الأنسجة الميرستيمية وأجزاء البادرات حيث تكون معظم الخلايا فى الحالة الميرستيمية وبالفعل أكدت كثير من الدراسات هذه الظاهرة (George, 1993). وهناك بعض الاستثناءات البسيطة كزيادة معدل التغييرات الوراثية فى الكالس المتكشف من البراعم الجانبية لنباتات البطاطا الحلوة (Moyer and Collins, 1983). كما يستثنى من ذلك أنسجة الأوراق الفلقية لبعض الأنواع النباتية حيث تحتوى على نسبة عالية من التضاعف الكروموسومى مقارناً مع الأنسجة الأخرى. وقد كانت كل نباتات الأناناس المتكشفة من syncarp وهى (اتحاد عدد من المبايض مع بعضها) وكذلك تلك التى مصدرها slip السيقان الصغيرة التى تنمو تحت الثمار) متباينة، بينما انخفض هذا المعدل إلى ٧% فقط

من النباتات المستولدة من الكالسات التى مصدرها منطقة التاج (Wakasa, 1979). وكذلك كان العديد من النباتات التى مصدرها كالس من البذور متباينة على العكس من النباتات التى مصدرها كالس من النورات الزهرية. وفى العديد من الحالات وجد أن النُبيتات المتكشفة من استعمال الأوراق الفلقية بينها تباين أكثر بالمقارنة مع استعمال الأوراق الحقيقية (Bhojwani & Razdan 1996).

٣. التغييرات الحادثة أثناء الزراعة

يرجع جزء كبير من التغييرات الوراثية الحادثة فى زراعة الأنسجة إلى ظروف الزراعة نفسها التى تسبب تلك التغييرات والتى يمكن الاستفادة منها فى الانتخاب والتحسين النباتى كما هو مبين فى الشكل رقم (٧-٤) حيث من السهل التحكم فى تلك الظروف وتوجيهها لإحداث معدل عالى من التغييرات الوراثية.



شكل ٧-٤: انتخاب نبات متباين وراثيا عن النبات الأم باستعمال الانتخاب المعملى لخلايا حدث بها تباين أثناء الانقسام (Stafford & Warren, 1991).

أنواع التغييرات الوراثية فى مزارع الأنسجة

١. التغييرات الكروموسومية العددية Numerical chromosomal aberrations

غالباً تكون الخلايا الميرستيمية الموجودة فى الكالس أو معلق الخلايا متشابهة وثابتة وراثياً. لكن لوحظ أن زيادة فترة زراعة الخلايا فى المعمل تسبب وجود مستويات متباينة من الحامض النووى فى الخلايا الفردية ذات الفجوات الكبيرة ، والتى غالباً توجد طافية فى المعلق. وعادة تحتوى تلك الخلايا البرانشيمية على حالات من التضاعف الكروموسومى مشابهة لتلك الموجودة فى خلايا النبات العادى التى سبق ذكرها. وفى معظم الحالات لا تنقسم الخلايا التى بها تضاعف غير تام endopolyploid، لكن لو تم استحثاث هذه الخلايا للانقسام فإن مستويات مختلفة من التضاعف تتضح فى النسل المستولد. وقد أتضح بالفعل أن مستوى endoreduplication فى مزارع الأنسجة أكثر مما كان يعتقد.

لكن يبدو أن نوعية التغييرات ترتبط بشكل مباشر بنوع النباتات (Kaeppler *et al.*, 2000) فقد سجلت معظم الأبحاث فى نباتات الشوفان ارتباط كبير بين معدل التضاعف الكروموسومى والتغييرات فى الشكل الظاهرى للنباتات المتكشفة معملياً. وعلى العكس من ذلك كان معدل التضاعف أقل من الكسور الكروموسومية فى نباتات الشعير. ورغم أهمية التضاعف التام فى برامج التربية فإن عدم ثباته الوراثى يعيق الاستخدام الواسع له (Neumann*et al.*, 2009). ويلعب عمر المزرعة دوراً هاماً فى مدى حدوث التغييرات الوراثية فى الكالس والنُبيتات الناتجة. وبفرض أن خلية ما حدث بها تغير وراثى فإن احتمال انقسامها ومشاركتها فى تكشف نبيتات تعتمد على الظروف بالمزرعة.

من الطبيعى أن تتسبب التغييرات الوراثية فى تقليل فرصة انقسام الخلايا فى الظروف العادية. إلا أن الخلايا فى زراعة الأنسجة لا تخضع لهذه القاعدة وتستمر الخلية

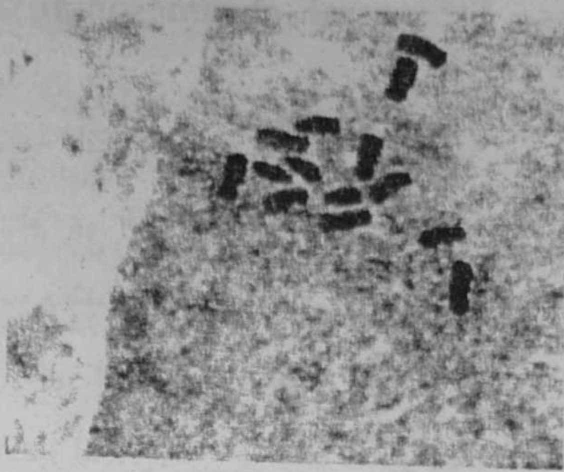
فى الانقسام ويتوقف ذلك على شدة التغييرات الوراثية الموجودة بالخلية. فالتغييرات الوراثية الشديدة قد توقف انقسام الخلية أو تفضى إلى إنهاء حياة الخلية أو عدم تكشفها. لكن تختلف صور التغييرات الكروموسومية العددية سواء كانت من النوع التام polypolidy أو غير التام aneuploidy حتى فى نفس التجارب المتشابهة تماما. وبالطبع يصعب مع ذلك التنبؤ بالتغييرات الوراثية المتوقعة. ومن المعروف أن حالات التضاعف غير التام aneuploidy غير شائعة الحدوث فى الطبيعة إلا فى النباتات المتضاعفة بطبيعتها لكنها شائعة الحدوث فى زراعة الأنسجة، وبالفعل ظهرت حالات مختلفة من التضاعف فى العديد من النباتات الناتجة من زراعة أنسجة الدخان والجزر والفول وكثيراً من نباتات الزينة. كما لوحظت حالات من التعدد غير التام فى النباتات المتكشفة من مزارع متوك البيتونيا والداتورة وغيرها من النباتات.

وقام Ahmad *et al.* (2010) بدراسة عدد الكروموسومات فى مزارع المعلق الخلوى وكذلك نباتات الكمون المستولدة منه وسجل تباين أعداد الكروموسومات بين ١٢ و ٢٨ كروموسوم على الرغم من العدد الطبيعى هو ١٤ كروموسوم. لكن كان أغلب النباتات والخلايا ذات أعداد طبيعة من الكروموسومات (شكل رقم ٧-٥). ويمكن إحداث التضاعف الذاتى بإضافة الكلوشيسين للنباتات مباشرة، فقد تم الحصول على ٤٨٠ نبات متضاعف من مزرعة خلايا إحدى الهجن النوعية فى الجنس *Saccharum* بإضافة ٥٠ ملجم/لتر من الكلوشيسين إلى بيئة النمو لمدة أربعة أيام. ومن المهم الإشارة إلى وجود حالات من التضاعف الذاتى الداخلى بمعنى وجود أشكال مختلفة من الأنوية غير كاملة بسبب تكوين أكثر من زوج من خيوط المغزل، ولمنظمات النمو دور مهم فى ذلك (D'Amato *et al.*, 1980).

التغييرات الكروموسومية التركيبية Structural chromosomal aberrations

بالإضافة إلى التغييرات الكروموسومية العددية التى سبق الإشارة إليها أشار Lee & Phillips (1987) أن زراعة الأنسجة قد تؤدى إلى حدوث تغييرات كروموسومية تركيبية أى فى التركيب الظاهرى للكروموسوم شكل رقم (٧-٦). فأحياناً تحدث كسور يترتب عليها فقد لأجزاء من الكروموسوم أو تغير فى ترتيب أجزاء الكروموسوم بالنسبة لبعضها البعض إذا حدث إعادة التحام لهذه الأجزاء فى غير ترتيبها الطبيعى أثناء انقسام الخلايا. وينتج عن ذلك صور مختلفة من التغييرات التركيبية. وقد وصف Larkin *et al.* (1985) التغييرات الكروموسومية التركيبية من نوع الفقد والانتقال والانقلاب وغيرها فى ١٤ نوع نباتى. كما بين وجود تغييرات تركيبية فى ١٧ نبات قمح سداسى منها ١٤ نبات تحتوى على تضاعف aneuploidy و ٤ نباتات euploid وذلك من بين ٥٥١ نبات تم تكشفها. وقد درس Lee & Phillips (1988) طريقة حدوث هذه التغييرات باستفاضة وبينا أن التضاعف المتأخر فى مناطق heterochromatin هو السبب الرئيسى فى التباين الوراثى فى الذرة، أما التباين فى نباتات الفول *Vicia faba* فيرجع فى الأساس إلى العناصر النقالة. لكن يجب الإشارة إلى أن فرصة الخلايا التى بها تضاعف كروموسومى للاشتراك فى تكشف النباتات أعلى من الخلايا التى بها طفرات تركيبية. ويعتبر هذا من صور الانتخاب الطبيعى حيث تستبعد الخلايا التى بها طفرات لتقلل من نسبة إستيلاد نباتات متباينة وراثياً.

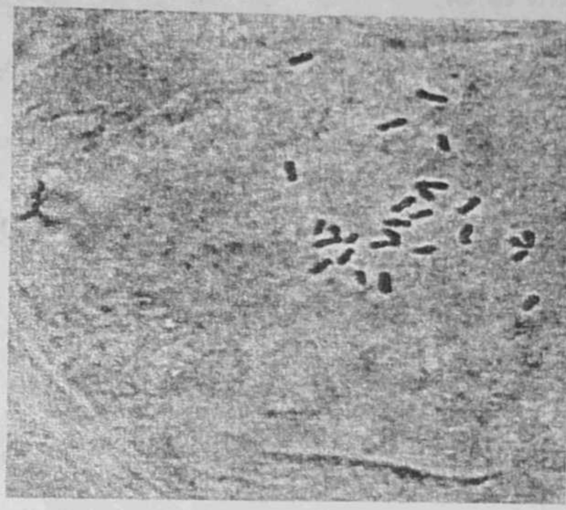
ومن صور التغييرات التركيبية التى وجدت أيضاً فى زراعة الأنسجة انتقال جزء من أحد الكروموسومات إلى كروموسوم آخر ربما يكون غير الشبيه. كذلك حدوث كسر فى منطقة السنترومير وبالتالى يتحول الكروموسوم الواحد إلى كروموسومين. وقد لوحظ أيضاً فى بعض مزارع الأنسجة وجود الكروموسومات الحلقية أو الكروموسومات ثنائية أو متعددة السنترومير (Lee & Phillips, 1988).



خلية طبيعية (2n=14)



خلية Aneuploid (2n=12)



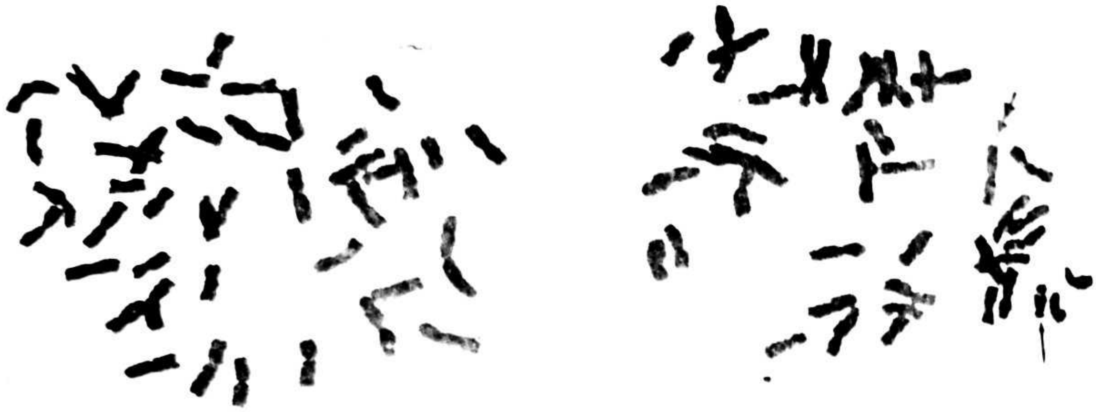
خلية بها تضاعف رباعى (2n=28)



خلية Aneuploid (2n=27)



شكل ٧-٥: بعض صور التغييرات الكرموسومية العددية فى المعلق الخلوى بزراعة السويقة الجنينية العليا لنباتات الكمون (فى الأعلى والوسط) والنباتات المستولدة (فى الأسفل) Ahmad *et al.* (2010).



شكل ٧-٦: الكروموسومات الميتوزية العادية لخلايا القمم النامية لجذور القمح 2n= 6x=42 على اليسار. وعلى اليمين يتضح تأثير زراعة الأنسجة على الهيئة الكروموسومية لنفس النبات وذلك بفقد جزء كبير من أحد اذرع الكروموسوم المشار إليه بالسهم السفلى بالمقارنة مع الكروموسوم النظير الطبيعى المشار إليه بسهمين (Lee & Phillips, 1987).

ويمكن بطرق الفحص السيتولوجى تحديد بعض هذه الاختلافات، لكن هناك تغيرات أخرى تحدث بالجينوم ولا تكون بهذه الدرجة من الوضوح وتتطلب طرق فحص أكثر تخصصا للكشف عنها مثل (RFLP).

٣. التغييرات فى العناصر النقالة Transposable elements

كما سبق القول هناك بعض التغييرات الوراثية المختفية والتى لا تتضح بالفحص الخلوى كتنشيط أو إعادة تغير موضع العناصر النقالة والتى تؤدى إلى حدوث طفرات فى بعض الجينات. والعناصر النقالة عبارة عن تتابعات وراثية لها القدرة تحت ظروف معينة على التحرك من موقع لآخر داخل نفس الكروموسوم أو كروموسوم آخر. وهذه العناصر مختلفة الأنواع وليست نوعا واحداً. ويسبب انتقال هذه العناصر من موضع إلى أخر تثبيط أو تغيير غير ثابت غالباً فى فعل بعض الجينات المجاورة لها أو التى تولج بداخلها. ويتوقف تأثير العناصر النقالة فى إحداث التباين فى الشكل الظاهرى على عدد المواقع النشطة لها. وبجانب التأثير المثبط المؤقت لهذه العناصر فإنها قد تؤدى إلى إحداث تضاعف فى أجزاء من الحامض النووى وإعادة ترتيب الجينوم كحدوث انقلاب أو فقد لجزء من الكروموسوم.

وتؤدى ظروف زراعة الأنسجة إلى تنشيط هذه العناصر فقد أشار Hirochika *et al.* (1996) أن قدم عمر مزارع خلايا الأرز يؤدى إلى تنشيط ثلاث عائلات من العناصر النقالة هى (*Tos10*, Tos17, and *Tos19*) وبزيادة نشاطها ارتفع معدل نسخ الحامض النووى. لكن تظل ميكانيكية استجابتها وتنشيطها فى زراعة الأنسجة غير معروفة، فعلى الرغم من المعدل المنخفض لتنشيط العناصر النقالة فقد تبين أن العناصر النقالة *Ac–Ds* و *Spm/En* المعقدة فى الذرة تنشط بمعدل عالى عقب زراعة أنسجتها بالمقارنة مع النباتات الناتجة من البذور (Peschke & Phillips, 1991 و Peschke *et al.*, 1991) وعلى العكس من بعض الدراسات الأخرى لم يكن هناك ارتباط بين تنشيط هذه العناصر وميثلة الحامض النووى. وأيضاً لم يبين الفحص الخلوى أى ارتباط بين تنشيط العناصر النقالة فى النباتات المستولدة والكسور الكروموسومية. ويعتقد أن تلك العناصر النقالة لها دور فى التكشف. وبصفة عامة التغييرات التركيبية أكثر حدوثاً فى زراعة الأنسجة من التغييرات العددية. ولأن التغير فى الشكل الظاهرى يكون أكثر تأثراً بالتغييرات التركيبية عن العددية فإن الاعتماد على التغييرات العددية كدليل للتغير الوراثى فى زراعة الأنسجة يكون غير دقيق.

٤. التغييرات الكيميائية الحيوية

يرجع معظم التباين فى مزارع الأنسجة إلى التغييرات فى التركيب الكيميائى للحامض النووى، لكن ليس من الضرورى أن يترجم بتغيير فى الشكل الظاهرى، وربما يتطلب الأمر بعض الاختبارات الدقيقة للكشف عنها. والعديد من هذا النوع من التغييرات يفقد أثناء التكشف أو لا يورث بطريقة مندلية. ومن هذا النوع الخلل الشائع فى بعض النباتات النجيلية كالأرز والقمح فى أيض الكربون الذى يسبب تكشف نباتات خالية من الكلوروفيل وكذلك الخلل فى أيض النشا والكاروتينات والنتروجين ومقاومة المضادات الحيوية. ويعتبر اكتساب مقاومة المضادات الحيوية

أو الحساسية لها ذات أهمية كبرى فى إنتاج النباتات المحورة وراثيا (Jayasankar, 2005).

أسباب التباين الحادث فى زراعة الأنسجة

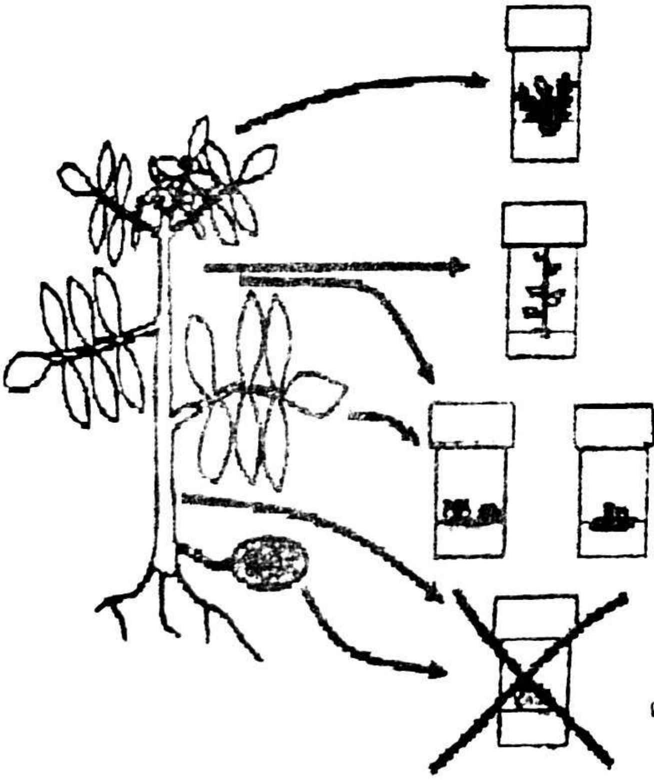
١. النوع النباتى والجزء المستعمل للإكثار

يختلف مدى حدوث التباين فى الخلايا والنُبيتات الناتجة باختلاف الأنواع النباتية، فبعض الطرز الوراثية مثل Lily و Hyacinth و Ornithogalum وبعض أصناف Saintpaulia تظهر ثباتا وراثيا فى زراعة الأنسجة بدرجة كبيرة حتى أثناء التكاثر بالبراعم العرضية، على العكس من بعض الأنواع مثل Freesia و Begonia اللذان يظهران معدلات عالية من الطفرات. وأكثر حالات الثبات الوراثى للكالس وجدت فى كالس نخيل الزيت. وعندما تستعمل أنسجة نباتية من خلايا ليس بها تضاعف فإن الكالس أو الخلايا الناتجة غالبا ما تكون ثنائية العدد الكروموسومى. ويمكن الحفاظ على هذا المستوى من الثبات لمدة طويلة باستعمال الأنسجة الميرستيمية. ولا يقف معدل التباين على النوع النباتى فقط بل يبين Mandal *et al.* (2000) فى جدول رقم (٧-١) التباين أن عدد النباتات التى تكشفت ومعدل الطفرات اللونية فى أزهار الاراولا عقب المعاملة ببعض الأشعة قد تأثر بدرجة عالية باختلاف المُستأصَل النباتى. كما يبين الشكل رقم (٧-٧) أن طريقة التكاثر والجزء النباتى المستعمل لهما تأثير على معدل التباين الحادث فى زراعة الأنسجة (George, 1993).

جدول ٧-١: تأثير استعمال أجزاء نباتية مختلفة على التكشف واستحداث الطفرات فى نباتات الأراولا.

مصدر الجزء النباتى	عدد النباتات المتكشفة	عددالطفرات	%لطفرة لونية ثابتة
عقد ساقية	٤٠٤	٢٦٠	٦٤
قمم الأفرع	٦٣	١٢	١٩
السلاميات	٩٠	٨	٩
الأزهار الشعاعية (البنفسجية)	٤٨	٤٨	١٠٠
الأزهار الشعاعية (البيضاء)	١٩٦	١٩٦	١٠٠

يعتقد الكثير أن هناك درجة عالية من الثبات الوراثى لمزارع الأجنة الجسدية بالمقارنة مع تكشف الأعضاء، لكن هناك الكثير من الدراسات تشير إلى عكس ذلك. لكن يبدو أن الحساسية للتغيرات الوراثية تختلف باختلاف الأصنا ف والسلالات النباتية، فالكالسات الناتجة من الأنواع المفتوحة التلقيح من Lettuce كانت محتوية على صور مختلفة من التضاعف عن تلك الموجودة فى الكالسات الناتجة من النباتات الأم. وبعض النباتات الثنائية مثل Asparagus و Hemerocallis لها قدرة عالية على الاحتفاظ بالعدد الثنائى والقدرة على التكشف حتى بعد فترة طويلة نسبيا من إنتاج الكالس. لكن من غير المعروف كيف يلعب التركيب الوراثى هذا الدور.



شكل ٧-٧: تأثير الجزء المستعمل للإكثار وطريقة الإكثار الدقيق على التباين الحادث فى زراعة الأنسجة (George, 1993).

٢. ارتباط مجموعات الميثيل بالحامض النووى DNA-Methylation

حتى وقت قريب لم يكن معروفاً لماذا تحدث التغييرات الوراثية فى زراعة الأنسجة. لكن من الثابت الآن أن معظم إن لم يكن كل التغييرات الوراثية المورثة فى زراعة الأنسجة ترجع بطريقة مباشرة أو غير مباشرة إلى تغير فى عدد مجموعات الميثيل المرتبطة بالحامض النووى. وتعمل الميثلة ببساطة على عدم نسخ الجين مما يوقف تعبيره عن نفسه. وهذا التغيير فى ميثلة الحامض النووى ربما يرجع كما أشار Munksgaard*et al.* (1995) إلى:

١. تكوين أو تنشيط بعض الإنزيمات الخاصة بعملية الميثلة.

٢. نقص معدل تخليق أو تثبيط الإنزيمات التى تقوم بعكس عملية الميثلة أى نزع مجموعات الميثيل من الحامض النووى.

٣. تغيير تركيز المواد أو العوامل المساعدة التى تشارك فى هذه التفاعلات. فالتغير فى معظم الصفات الكمية بل حتى تنشيط العناصر النقالة والكسور الكروموسومية وتأخير نسخ بعض المناطق فى الكروموسومات قد ترجع إلى عملية ميثلة للحامض النووى Phillips *et al.* (1994) . فإذا كان عدد تلك المجموعات كبير يحدث تثبيط للجين، وبانخفاض عددها يزيد نشاطه. وعلى العموم هناك معدل ونظام طبيعى لارتباط مجاميع المثيل بالحامض النووى. ويزيد ارتباط مجموعات المثيل بالأحماض الأمينية الأدينين والسيتوسين فى مزارع الأنسجة. لكن ربما ل ا يتضح تغيير فى الطرز المظهرى بسبب ذلك وقد سجل بالفعل تغيير فى ارتباط مجموعات الميثيل فى مزارع أنسجة الذرة والبطاطس والعنب لكن لا يعرف سبب ذلك (Jayasankar, 2005). وبناءاً على تلك النظرية فإن زيادة أو نقص مجموعات الميثيل المرتبطة بالحامض النووى يكون سبباً فى:

- حدوث الطفرات النوعية فى الجينات المتحكمة فى جين واحد أو أكثر.
- زيادة نشاط العناصر النقالة التى تكون فى حالة ساكنة.
- تحفز التغير فى الصفات الكمية.
- تنشيط الطفرات التى تحدث بسبب الكسور الكروموسومية.

إن حدوث كسر فى أحد الكروموسومات أو تغير مستوى ارتباط مجموعات الميثيل فى أحد المواقع ينتج عنه زيادة ارتباط مجموعات الميثيل بمناطق أخرى وكذلك تنشيط عناصر نقالة أخرى، وبالتالى فإن حدوث تغيرات وراثية يؤدى إلى حدوث المزيد من التغييرات الوراثية الجديدة وبالتالى زيادة معدل التباين. وقد أكد Joyce & Cassells (2002) باستخدام تقنية AFLP تأثير ارتباط مجموعات الميثيل بحامض السيتوزين على حدوث تغييرات ظاهرية فى نباتات البطاطس المستولدة من زراعة الأنسجة. وفى معظم الحالات كان هناك ارتباط بين التغيير فى الطرز المظهرية والتغير فى معدل ارتباط الميثيل بالسيتوزين. كما أن هناك العديد من الدلائل التى تؤكد أن زيادة نشاط العناصر النقالة وارتباط مجموعات الميثيل من الأسباب التى تؤدى إلى انخفاض معدل التكشف بقدم عمر المزرعة. ويمكن القول أن نشاط العناصر النقالة هو السبب فى التغييرات الوراثية فى الكالسات والخلايا التى تحدث عند الاحتفاظ بالمزرعة لفترة طويلة.

بفرض أن التغير فى مستوى ارتباط مجموعات الميثيل بالحامض النووى فى الخلية التى تكشف منها النبات هو المسئول عن التغييرات الوراثية فما هو سبب هذا التغير فى معدل الارتباط؟ قد يقال أن الظروف غير العادية للزراعة المعملية تؤدى إلى خلل فى العمليات الفسيولوجية فى الخلايا مسبباً هذا الخلل الوراثى. لكن يبدو أن هذا التصور غير مقنع، حيث لا توجد غالباً تغييرات وراثية فى مزارع القمم الميرستيمية ومزارع الأعضاء المنزرعة تحت نفس الظروف البيئية التى تحدث تغييرات وراثية فى بعض الأجزاء النباتية الأخرى. لكن من المعروف أن الأوكسين يؤدى إلى زيادة ارتباط مجموعات الميثيل بالحامض النووى، ويحدث ذلك بطريقة عشوائية. وتختلف هذه التغييرات باختلاف نظام الزراعة بل قد يعود بعضها إلى مواد التعقيم السطحية المستعملة لتعقيم النسيج (George, 1993).

٣. الخلل فى تضاعف الحامض النووى

يتم تضاعف الحامض النووى للكروموسوم أثناء المرحلة S من دورة انقسام الخلية حيث يتم ابتعاد شريطى الحامض النووى عن بعضهما البعض ثم يتم نسخ كل منهما لعمل نسخة مكملة له. ولا يتم نسخ كل أجزاء الكروموسوم فى ذات الوقت فبعض مناطق Heterochromatin والتى يعتقد أنها خاملة وراثياً بمعنى أنها لا تحتوى على جينات فعالة لكنها تلعب دوراً فى ميكانيكية عمل الكروموسوم يتم نسخها بعد المناطق الأخرى من الحامض النووى وهى التى تحدث فيها الكسور الكروموسومية. وفى زراعة الأنسجة يعتقد أن تضاعف الحامض النووى يتم متأخراً فى المرحلة S من دورة الخلية. لذا فإن مناطق Heterochromatin قد لا يحدث لها تضاعف بصورة كاملة قبل انقسام الخلية. وربما يعود ذلك إلى السرعة غير العادية فى معدل انقسام الخلايا. وبذلك يحدث الكثير من التغييرات الكروموسومية مثل التضاعف والكسور والتغييرات الوصفية. وفى الثدييات وجد أن زيادة ارتباط مجموعات الميثيل يكون مرتبط بالتأخر فى نسخ الحامض النووى وقد تكون هذه الحقيقة صحيحة أيضاً فى الأنسجة النباتية (George, 1993) و (Gaha & George, 2008).

٤. نقص بادئات الأحماض النووية

تتطلب عملية الانقسام السريع للخلايا فى معظم أنواع مزارع الأنسجة تخليق كمية كبيرة من المواد اللازمة لتخليق الأحماض النووية مثل القواعد النتروجينية، وكذلك العديد من الإنزيمات والبروتينات الضرورية لتضاعف المادة الوراثية. ويؤدى عدم توافر هذه المواد إلى حدوث معدل عالى من الطفرات. وفى بعض التجارب أدت إضافة بعض الأحماض الأمينية كالتربتوفان إلى تقليل معدل الطفرات وثبات الانقسام الخلوى (George, 1993).

٥. منظمات النمو

مما لاشك فيه وجود تأثير الظروف البيئية المختلفة خاصة تلك التى تمثل عوامل إجهاد على نشاط الجهاز الوراثى فى الخلية. ولما كانت ظروف مزارع الأنسجة نفسها من منظمات نمو وعناصر مغذية بل وحتى المواد المستعملة فى التعقيم السطحى تمثل صور مختلفة من عوامل الإجهاد فإنها تقود إلى العديد من التباينات فى النباتات المستولدة. وهناك العشرات من الدلائل على ذلك كحدوث تضاعف فى نباتات *Crepis capillaris* الناتجة من زراعة الأنسجة على الرغم من حقيقة الثبات الوراثى لها، كذلك التباين الحادث فى النباتات الناتجة من خلية فردية أو فى مزارع البروتوبلاست (Bhojwani & Razdan, 1996). يعتبر نمو الكالسات ومعلق الخلايا صورة غير عادية من النمو ولكى يتحقق هذا الغرض لابد من إضافة تركيزات عالية من منظمات النمو خاصة الأوكسينات. ومن المؤكد أن التركيب الوراثى لعشيرة من الخلايا فى الكالس أو المعلق الخلوى يتأثر بتركيز كلاً من الأوكسينات والسيتوكينينات المضافين إلى وسط النمو. وغالباً تكون نسبة الخلايا العادية الثابتة وراثياً أعلى فى البيئة المحتوية على تركيزات أقل من منظمات النمو أو فى حالة عدم وجودها كليا. ويتناسب معدل حدوث الطفرات مع وجود كلا النوعين من منظمات النمو.

ولقد أصبح معروفاً أن الأوكسينات من العوامل التى تزيد بشدة معدل حدوث التغييرات الوراثية، لكن تظل آلية هذا التغيير غير معلومة على وجه الدقة، ويعتقد أنها ترجع إلى زيادة معدل انقسام الخلايا التى بها تغييرات وراثية أصلاً أو زيادة ارتباط مجموعات الميثيل بالحامض النووى. وعادة يصاحب التركيزات العالية من منظمات النمو تغيير فى الطرز المظهرى كزيادة التفريع أو استطالة وربما تقزم النباتات لكن لا يورث هذا التباين فى معظم الحالات. وتختلف الأنواع المختلفة من الأوكسينات فى مدى إحداثها تغيرات وراثية فى زراعة الأنسجة، ويتوقف ذلك أيضاً على النوع النباتى. ويعتبر 2,4-D من أكثر الأوكسينات إحداثا للتغيرات الوراثية كذلك يعمل الكينيتين على

استحثاث انقسام الخلايا المتضاعفة. فعلى سبيل المثال وجد أن معدل التغييرات الوراثية فى زراعة الأنسجة لنباتات حبة البركة يتلازم مع زيادة تركيز 2,4-D مع ثبات تركيز الكينيتين.

واثبت LoSchiavo *et al.* (1989) أن معظم حالات المبثلة فى خلايا مزارع الجزر ترتبط مباشرة بالتركيز الهرمونى حيث قل معدلها عند استعمال الكينيتين زادت باستعمال 2,4-D. وفى الواقع هناك جدل حول تأثير 2,4-D حيث يعتبره البعض سبباً فى حدوث التضاعف بينما يشير البعض إلى أنه فقط يستحث الخلايا المتضاعفة على الانقسام لاسيما فى وجود بعض المركبات الأخرى. وفى استعراض موسع لهذا الموضوع يشير Bhojwani & Razdan (1996) إلى أن استعمال 2,4-D بتركيز مرتفع يصل إلى ٢٠ ملجم/لتر يزيد من انقسام الخلايا الثنائية أما التركيز المنخفض جداً (٠.٢٥ ملجم /لتر) فإنه يزيد من معدل الخلايا المتضاعفة فى مزارع خلايا البازلاء. وعموما تزيد السيتوكينينات من معدل انقسام الخلايا فى زراعة الأنسجة،وعند إضافتها بتركيز منخفضة يقل معدل التضاعف فى المعلق الخلوى. كما تلعب نسبة الأوكسينات إلى السيتوكينينات دوراً فعالاً فى التباين الوراثى. وقد زاد معدل التباين بشدة فى نباتات نخيل الزيت الناتجة من مزارع المعلق الخلوى بسبب استعمال الأوكسينات، أما كالسات العنب فقد فقدت قدرتها على التكشف بطول مدة زراعتها فى بيئة محتوية على الأوكسينات (Jayasankar, 2005).

٦. المكونات الأخرى لبيئة النمو

تعد مكونات البيئة أحد العوامل التى تؤثر على مستوى التضاعف الكروموسومى ونسبة الخلايا المحتوية على اختلافات وراثية. وكلما زاد محتوى البيئة من العناصر المختلفة زاد احتمال حدوث خلل وراثى خاصة حالات التضاعف الكروموسومى أثناء الانقسام. فقد لوحظ فى مزارع خلايا الجزر زيادة عدد الخلايا

المحتوية على أعداد غير عادية من الكروموسومات بزيادة تركيز الفوسفات فى بيئة MS. وزادت نسبة الخلايا الثنائية عندما نقل الكالس إلى نفس البيئة لكن مع خفض تركيز النتروجين إلى الربع. وفى تجربة أخرى زاد معدل الخلايا الأحادية فى المعلق الخلوى لنباتات Datura بوجود النتروجين فى صورة أمونيا ونترات على العكس من وجوده فى صورة عضوية. وقد استردت معظم الخلايا حالتها العادية من التضاعف ٣٠% ثنائى من العدد الكلى عندما نقلت إلى بيئة محتوية على النتروجين فى صورة عضوية فقط (Furner *et al.*, 1978). والغريب انخفاض قدرة خلايا الجزر على تكوين الأجنة الجسدية فى بيئة White بالمقارنة مع وسط MS. وفى مزارع متوك القمح وجد أن عدد الأفراد الألبينو يتأثر بمستوى نترات البوتاسيوم المضافة، وربما يرجع ذلك إلى حدوث فقد فى الحامض النووى الموجود بالسيتوبلازم. كذلك تؤدى المواد المخلبية مثل EDTA وبعض العناصر الثقيلة إلى زيادة الكسور الكروموسومية. وذلك بسبب الشحنات السالبة الموجودة على أيونات هذه المعادن ومقدرة أيوناتها على تكوين معقد ثابت مع بعض المكونات الأخرى بالخلية ويعتقد أن الزنك هو أكثر هذه الأيونات تأثيراً والكالسيوم أقلها طبقاً لترتيب (George, 1993) التالى Zn>Cu>Ni>Co>Fe>Mn>Ca. ويضيف (Semal Lepoivre, 1990) أن استعمال كلوريد الكالسيوم زاد من معدل التغييرات الكروموسومية فى صنف البطاطس 'Bintje'.

٧. ظروف المزرعة

يعمل تقصير الفترة الزمنية التى يتم بعدها نقل المزرعة إلى بيئة جديدة كأن تكون أسبوعين بدلاً من ثلاثة على الحد من التغييرات الوراثية. كذلك تؤثر طبيعة البيئة على مدى حدوث التباين، ففى مزرعة أنسجة لنبات Hevea لوحظ زيادة معدل التضاعف عند استعمال بيئة سائلة بالمقارنة مع البيئة شبه الصلبة. وأمكن الحصول على خلايا ثابتة من الناحية الوراثية فى المعلق الخلوى لنبات *Hemerocallis spp* باستمرار إجراء تصفية للمعلق الخلوى لعزل كتل الخلايا التى تتميز بالنشاط الانقسامى وإعادة زراعتها

وأنتجت هذه الخلايا عند تكشفها نباتات ثنائية ومطابقة للنبات الأم. بينما تسبب ترك المعلق دون إجراء تصفية وانتخاب الخلايا الميرستيمية فى زيادة معدل التباين الوراثى فى النباتات المستولدة (George, 1993).

يزيد وجود تركيزات عالية من الأكسجين فى وسط النمو أو عدم قدرة الخلايا على حفظ نفسها من اثر الأكسدة من حدوث تغيرات وراثية بالخلية. وتلاحظ هذه الظاهرة بوضوح أثناء عزل وزراعة البروتوبلاست. وعلى العموم لا يتوقف تأثير عوامل الأكسدة على عزل وزراعة البروتوبلاست فقط، فقد ثبت أن الجروح التى لابد وأن تحدث أثناء إعداد الجزء النباتى تؤدى إلى تكوين بعض الشوارد الحرة فى الخلية مثل superoxide و hydrogen peroxide hydroxyl و peroxyl و alkoxyl radicals التى لها فعل مؤكسد عالى قد يؤدى إلى حدوث تغيرات وراثية فى الخلية إن لم يسبب أحيانا موت الخلية. وقد تضاف بعض مضادات الأكسدة للحد من ذلك. كذلك فإن بعض المواد المستعملة فى التعقيم السطحى للجزء النباتى كمركبات الهيبوكلوريت يحفز حدوث الأكسدة. ومن ثم تعمل مضادات الأكسدة كبعض الأحماض العضوية التى تضاف إلى بيئة النمو على الحد من تأثير الشوارد الحرة. كما أن بعض مواد التعقيم السطحية المستعملة تعمل على تكوين بعض الشوارد الحرة free radicals التى تزيد من احتمال حدوث تغيرات وراثية. كما تؤثر درجة الحرارة التى تحفظ عليها المزرعة على درجة الثبات الوراثى لها، حيث وجد (Binns & Meins (1980 أن حفظ بعض المزارع على درجة حرارة ٣٥ °م يزيد من التضاعف الكروموسومى الثلاثى بالمقارنة مع تلك المحفوظة على ٢٥°م. كذلك زاد عدد النباتات البينو فى النباتات *Lilium longiflorum* المستولدة من الأجنة الجسدية للنباتات عند حفظ المزرعة على درجة حرارة ١٠-١٥ °م (Jackson & Dale,1988).

يتناسب معدل حدوث التغييرات الوراثية الجسدية وبصورة خاصة التضاعف الداخلى بدون انقسام النواة والخلية طردياً مع عمر المزرعة. فزيادة عمر المزرعة قد يسبب زيادة فى معدل الطفرات أو تراكمها، وتقف منظمات النمو ونوع النتروجين وتركيزه والضغط الاسموزى وراء ذلك. ومن ثم يفضل أن يتم تأسيس المزرعة من مستأصل نباتى جديد كل فترة عن استمرار تجديدها من الأنسجة المتحصل عليها فى المعمل. وفى معظم الحالات يلاحظ عدم حدوث تباين فى النباتات المستولدة عقب تأسيس المزرعة فى معظم الحالات التى سجل فيها تباين شديد بين النسل المستولد بعد تجديد المزرعة لعدة مرات فى المعمل، قد وجد أن النباتات المستولدة من كالس الدخان الذى تم الاحتفاظ به معملياً لمدة طويلة كانت عقيمة ولم تنتج بذوراً أما النباتات التى تكشفت من كالسات عمرها قصير كان معدل التباين الوراثى بها أقل. لكن على العكس من هذه القاعدة يلاحظ وجود معدل عالى من التغييرات فى النباتات الناتجة من مزارع البروتوبلاست رغم قصر عمرها. ويمكن إرجاع ذلك إلى تعرض البروتوبلاست لعوامل الأكسدة أثناء العزل والزراعة. قام Rodrigues *et al.* (1998) بتأسيس مزرعة أنسجة أحد أصناف الموز باستخدام القمم النامية. وقام بتجديد المزرعة عديد من المرات، وحصل من هذه المزارع على عدد ٣٨٧٤ نبات. ولم يسجل أى تباين فى النباتات الناتجة حتى التجديد الثالث، ولاحظ بدء ظهور التباينات بعد التجديد الخامس بمعدل ١.٣، و١.٣، و٣.٨، و٢.٩% بعد التجديد الخامس، السابع، التاسع والحادى عشر على التوالى. ويشير Jambhale *et al.* (2001) إلى الارتباط بين معدل التباين بعد تجديد مزارع الموز ١٨ مرة وقدرتها على التضاعف.

استخدام التباينات الجسدية فى الانتخاب المعملى

بعد الاستعراض السابق للتغييرات الوراثية المعملية يتضح أن زراعة الخلايا والأنسجة النباتية قد أتاحت فرصة كبيرة فى عمليات الانتخاب على مستوى الخلايا

والأنسجة وخاصة فى حالات الانتخاب لمقاومة الإجهاد البيئى أو الإحيائى. وبالفعل تم انتخاب العديد من السلالات الطفرية mutant cell lines عن طريق تعريض الخلايا لمستويات عالية تصل إلى درجة السمية من بعض المركبات مثل كلوريد الصوديوم أو أحد مبيدات الحشائش أو مشابهات الأحماض الأمينية، فتموت الخلايا التى ليس لها القدرة على تحمل هذا التركيز وتظل الخلايا التى لها القدرة على تحمله بسبب قد يكون وراثياً أو وظيفياً. فإذا تمكنت هذه الخلايا من التكشف إلى نبات فربما يحمل نفس صفة التحمل لهذا المركب ويورثها إلى نسله، هذا بالطبع لو كان التغيير الحادث فى الخلية المنتخبة وراثياً، واستخدمت هذه الطريقة فى التحسين الوراثى لكثير من النباتات. لكن يعيب هذه الطريقة عدم إمكانية استخدامها لتحسين الصفات المحصولية. كما أن هناك بعض المعوقات الأخرى فى سبيل استخدام هذه التقنية حيث أن عديد من الخلايا المنتخبة تكون متباينة وراثياً بدرجة كبيرة وبالتالى فإن النباتات المستولدة منها غير مطابقة للنبات الأم. والمشكلة الأخرى أن الاستجابة التى تظهر على المستوى الخلوى قد تختفى على مستوى النبات الكامل فى الحقل لاختلاف ميكانيكية الاستجابة (Duncan, 1997) و (Veilleux & Johnson1998).

معظم التغييرات الحادثة فى مزارع الأنسجة تكون راجعة لحدوث طفرات فى التركيب الوراثى ويكون معدل حدوث تلك الطفرات فى المعلق الخلوى عالى جداً حيث يصل إلى٠.٠٠٣-٠.٠٠٧ طفرة/خلية فى الانقسام الواحد بدون إضافة أى مادة مطفرة George (1993). ويقل هذا المعدل بوضوح فى حالة زراعة الأعضاء الكاملة. وتزيد هذه النسبة بإضافة مواد مطفرة للبيئة أو معاملة الجزء النباتى بها قبل الزراعة. وتجدر الإشارة إلى أن المظهر الأولى الدال على وجود الطفرة فى الكالس هو وجود أجزاء متباينة فى اللون أو الشكل أو القوام. وبناءً على ذلك فإنه من المتوقع أن تكون النباتات المستولدة من أجزاء مختلفة ظاهرياً من الكالس مختلفة عن الأمهات ومتباينة فيما بينها أيضاً.

وتجدر الإشارة أن التباين فى الكالس يكون أعلى من التباين فى النباتات حيث تميل الخلايا التى لا تحوى تباين إلى التكشف بمعدل أعلى من تلك التى تحتوى على معدل عالى من الاختلافات لكن بالطبع لا تتضح كل الطفرات فى مرحلة الكالس وربما لا تتضح حتى فى طور البادرة أومرحلة النمو الخضرى، كأن تكون الطفرة مرتبطة بوجود ظروف بيئية معينة أو أن التعبير عنها يتم فى مرحلة الإزهار أو عقد وتكوين الثمار، وربما يكون التغير متعلق بصفات البذور الناتجة. وبدون شك فإنه يمكن بإتباع طرق وراثية متقدمة الكشف عن هذه التغييرات فى مرحلة مبكرة جداً وبمجرد حدوثها فى الخلية. ولعل سبب فقد معظم الخلايا القدرة على التكشف فى مزارع الأنسجة بتقدم عمر المزرعة هو تراكم العديد من الطفرات التى تحول دون حدوث التكشف ولا ينصح باستعمال مزارع أجنة جسدية عمرها أكثر من ٦ شهور للتكشف (Von Arnold, 2008).

وهذه التغييرات تشمل كلاً من الصفات الوصفية والصفات الكمية، ولا يقتصر حدوثها على المادة الوراثية الموجودة فى النواة فقط بل يحدث ذلك أيضاً فى المادة الوراثية الموجودة فى العضيات السيتوبلازمية، لكن من الثابت عملياً أن معظم الطفرات تحدث فى المادة الوراثية الموجودة بالنواة. وتكون نسبة الطفرات فى الصفات الوصفية منخفضة بالمقارنة بالصفات الكمية المتأثرة بالعوامل البيئية. وعلى العموم قد تتشابه هذه التغييرات مع التغييرات التى تحدث فى الطبيعة باستخدام بعض الكيماويات أو الأشعة المؤينة، لكنها تحدث بطريقة مختلفة وفريدة. فالطفرات الحادثة فى الطماطم باستخدام زراعة الأنسجة كانت مختلفة تماماً عن تلك المستحدثة بالمواد المطفرة (Gavazzi *et al.*, 1987). وكما سبق القول فالعديد من الطفرات الحادثة فى زراعة الأنسجة سلبية التأثير، ومن ثم فإن الاعتماد على زراعة الأنسجة كمصدر للتباين الوراثى -وإن كان قد ساهم فعلاً فى العديد من برامج التحسين النباتي- لن يحقق الهدف الذى عول عليه فى البداية.

الاستفادة من النباتات المتباينة وراثياً

كما سبق القول قد تحتوى السلالات النباتية التى تتكشف من الكالس والتى يطلق عليها السلالات الكالسية calli clones على تغيرات وراثية فيما بينها وكذلك بينها وبين النبات الأم. وتم وصف التباين الموجود بين كثير من النباتات المتكشفة معمليا لعديد من الأنواع النباتية فى عديد من الأبحاث. لكن فى معظم الأبحاث اكتفى بوصف تلك الاختلافات دون توضيح ما إذا كانت هذه التغييرات مقتصرة على الشكل الظاهرى للنمو الخضرى والأزهار من الناحية الكمية أو الوصفية كذلك المحصول أم هى انعكاس للتغير فى التركيب الوراثى بالتالى يمكن الاستفادة منها بصور عدة. ورغم أن الكالس قد يحتوى على خلايا متباينة وراثيا إلا أنه ليس من الضرورى أن يتكشف منها نباتات.

ويمكن التحكم فى بعض العوامل التى تحفز زيادة التباين الوراثى فى الخلايا وبالتالى ينعكس ذلك على النباتات المتكشفة. وأمكن باستخدام زراعة الأنسجة الحصول على أصناف جديدة من أنواع نباتية عدة منها على سبيل المثال *Pelargonium* و *Petunia* وقصب السكر والدخان. وتميزت هذه الأصناف المستولدة عن الصنف المستعمل كأمهات للإكثار إما من ناحية الشكل الظاهرى كبعض أصناف *Hemerocallis* المتقزمة التى أنتجت من الكالس، أو تكون الفروق فى بعض الصفات الوظيفية كالمقاومة للإجهاد البيئى مثل الملوحة أو الجفاف وكذلك المقاومة لبعض الأمراض. ويوضح جدول رقم (٧-٢) بعض الأصناف التى تم إنتاجها باستخدام somaclonal variation. وفى البرسيم الحجازى كانت النباتات الناتجة من كالس واحد غير متباينة من حيث الشكل الظاهرى لكن التلقيح الذاتى لهذه النباتات أنتج أفراد بينها تباين شديد ويدل ذلك على أن التغييرات الحادثة كانت متنحية (George, 1993).

تكون درجة التباين بين النباتات الناتجة من التكشف المباشر أقل من النباتات الناتجة من التكشف غير المباشر. ولهذا تستخدم طريقة التكشف المباشر للأفرع لإكثار

عدد كبير من نباتات الزينة خاصة تلك التابعة للعائلة Gesneriaceae حيث تستخدم أعناق الأوراق كمصدر للجزء المنزرع (George, 2008) . وفى بعض الحالات يتم تكشف الأفرع من خلايا طبقة البشرة Epiderme وفى البعض الآخر يتم اشتراك أكثر من طبقة من الخلايا فى تكشف الأفرع (Singh *et al.*, 2009) ومن ثم يكون هناك احتمال أكبر للحصول على كيميرا من النوع المحيطى Periclinal.

لكن أمكن إنتاج نباتات بينها تباين عند استخدام أجزاء نباتية محددة من *Begonia* فى مزارع الأشطاء. وكانت نسبة التباين أعلى عند استعمال النباتات ذات الأزهار المجوز من الصنف Rieger ذات الأزهار المفرد، على الرغم من أن الأشطاء تتكشف من طبقة خلايا البشرة وزادت نسبة التباين فى النباتات المستولدة عند فصل هذه الطبقة واستعمالها بمفردها كجزء منزرع دون الطبقات السفلى. ويكون بمزارع الجذور نسبة عالية من التباين الوراثى وغالبا تكون النباتات المتكشفة منها متباينة (George, 1993).

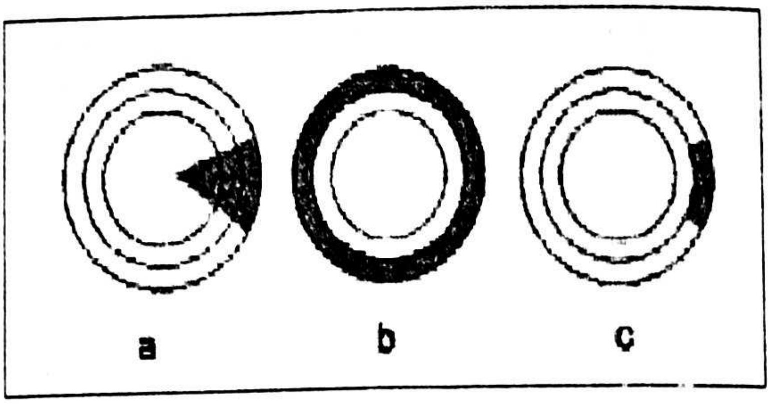
جدول ٧-٢: بعض الأمثلة للأصناف التى تم استنباطها باستخدام somaclonal variation (Jain, 2001 & Chawla, 2000).

النبات	الصفة الجديدة	الصنف المستنبط
Hemerocallus	Dwarf, short flowers, male sterile	Yellow Tinkerbell
Pelargonium	Aromatic content	Velvet Rose
Torenia fournieri	white flowers, compact plant	U Conn White
Oryza sativa	Picularia resistance, improved cooking quality	DAMA
	Rhizoctonia resistance, germplasm release	LSBR-5, LSBR-33
Musa	Fusarium wilt resistance	commercial cultivar
Wheat	High yield	'He Zu No.8
Lathyrus sativus	reduced neurotoxin in feed grain, high yield, early maturing	P-24
Potato	non-browning	White Baron
Zea mays	variant for grain & forage use	Yidan No.6
Blackberry	thornless	Lincoln Logan
Flax	salt & heat tolerance	ANDRO
Celery	*Fusarium* R	UC-TC
	Fusarium yellows resistance (*F. oxysporum*)	MSU-SHK5
	Fusarium yellow R, insect resistance (*Spodoptera exigua*),	K-26, K-108, & K-128
Tomato	Fusarium R	DNAP-17
	Tomato high solid contents	DNAP9
Cymbopogon	aromatic grass, 50–60% increased oil yield	CIMAP/Bio-13
Capsicum	yellow fruit,	Bell sweet
	early maturing & high yielding	cv A-D4
Brassica juncea	high yield, shattering resistant	Pusa Jai Kisan
Cyanodon dactylon	fall armyworm (Spodoptera) resistance	P1572566 Brazos-R3

الكيميرا ودورها فى التباين المظهري المنباتات الناتجة من زراعة الأنسجة

يطلق على الفرع أو النبات أن به كيميرا Chimara إذا اشترك عدد من الخلايا ذات الطرز الوراثية المختلفة معاً فى تكشفه بحيث يكون هناك عدة طبقات منفصلة ومتميزة عن بعضها البعض. وأثناء تكوين الكالس قد يلاحظ وجود أنسجة مختلفة عن بعضها البعض. وذلك إما لوجود اختلافات فى النسيج الأصلى المستعمل فى الزراعة أو لحدوث هذه التغييرات أثناء الزراعة كما سبق أيضاحه. وتحدث الطفرات فى الطبيعة بمعدل منخفض ولكن إذا لم تشترك الخلية التى بها طفرة فى تكوين أنسجة ميرستيمية وبالتالى تكوين أنسجة خضريه أو بذور أو حبوب لقاح فإن الطفرة لا ينتج عنها تكوين نسيج كيميرا واضح.

لكن لو حدثت الطفرة فى الخلايا الميرستيمية فإن طبقة واحدة أو أكثر من أنسجة النبات تكون مختلفة عن المجاورة. وهناك عدة طرق متباينة لتوزيع هذه الأنسجة فقد تكون فى طبقة طولية أو عرضية أو خارجية كما فى شكل رقم (٧-٧). ويرجع ذلك لكون الخلايا سريعة الانقسام الموجودة فى القمم النامية موجودة فى ثلاث طبقات منفصلة عن بعضها البعض؛ الطبقة L1 و L2 تكونان ما يسمى بالغطاء Lunica أما الطبقة الثالثة L3 فتكون ما يسمى بالبدن Corpus. وباقى الأنسجة النباتية بعد ذلك تكون امتداداً لإحدى هذه الطبقات. فالأشواك على سبيل المثال تتكون من الطبقة الخارجية فقط أما الجذور العرضية فإنها تتكون من الطبقة الثالثة الداخلية أما الأفرع العرضية فتتكون من الطبقة الخارجية فقط أو من الطبقتين الخارجيتين وربما من اتحاد الطبقات الثلاثة. وأول من وصف تكوين أفرع بها كيميرا فى زراعة الأنسجة هو Carlson & Chaleff فى سنة ١٩٧٤ حيث استطاعا الحصول على ٢٨ فرعاً بهم كيميرا من أصل ٧٠٠٠ نبات متكشفاً من البراعم العرضية لنبات *Nicotiana tabacum* و *N. glauca x N. langsdorffii*



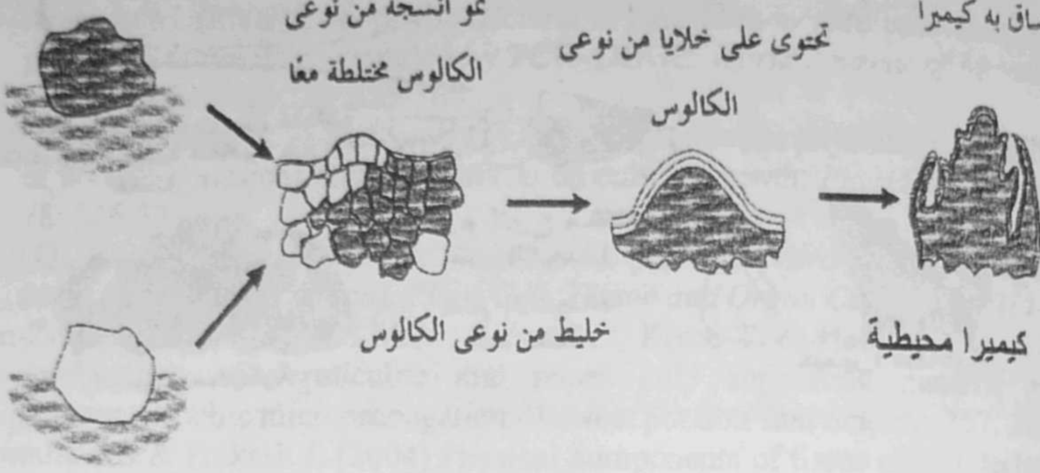
شكل٧-٧: قطاع عرضى فى القمة الميرستيمية لفرع يوضح الطبقات الثلاثة المكونة له L1, L2 و L3 ويتضح وجود الثلاث أنواع من الكيميرا (A) كيميرا قطاعية و (B) كيميرا محيطية و (C) كيميرا محيطية جزئية .(Burge *et al.*, 2002)

يحدث إعادة ترتيب فى الطبقات المختلفة المكونة لنسيج به كيميرا أثناء تكوين الكالسفى الإكثار المعملى، وبالتالى إذا تكشفت الأشطاء بطريقة غير مباشرة تتكشف نباتات بها صور متباينة من الكيميرا ومختلفة عن النبات الأم كما فى الشكل رقم (٧-٨). وبمجرد تكوين الكيميرا فإن الشكل الظاهرى الجديد قد يكون ثابتاً وبالتالى ينتقل بالإكثار الخضرى، ففى إحدى التجارب لإكثار نباتات *Chrysanthumum morifolium* كان ١٥% من النباتات الناتجة من الكالس متباينة ظاهرياً بالمقارنة مع النبات الأم حيث كانت أكثر تفريعا والأزهار أصغر حجما وشكلها غير عادى، ومتأخرة فى الإزهار لكن لم يكن من الواضح ما إذا كان السبب هو حدوث كيميرا أو تغيرات وراثية. ويمكن توضيح صعوبة استعمال الكيميرا الناتجة فى مزارع الأنسجة فى برامج تربية النبات فيما يلى:

١. صعوبة التحكم فى تحديد المناطق الميرستيمية التى تتكشف منها الأشطاء بالإضافة إلى أن بعض الأشطاء تتكون من براعم عرضية حتى فى حالة استخدام مزارع الأفرع.
٢. قد تشجع الزراعة المعملية انقسام نوع محدد من الخلايا دون الأخرى وبذلك يتم استبعاد أحد أنواع الخلايا فى التكشف.
٣. تؤدى سرعة انقسام الخلايا إلى إعادة ترتيب أو انقسام طبقة من الخلايا دون الأخرى مكونة صورة جديدة من الكيميرا.

ومن ثم اعترض موراشيج على استعمال الأنسجة المحتوية على الكيميرا فى الإكثار المعملى وعلى الرغم من ذلك نجح إكثار بعض أصناف *Chrysanthemum* وCarnation المحتوية على كيميرا. إن لم تتبع طريقة تضمن بطء الانقسام الخلوى للمحافظة على الكيميرا، ويتم ذلك بخفض تركيز السيتوكينين فى البيئة. لكن يبدو أن الكيميرا فى حد ذاتها تؤثر على مدى حدوث التكشف، حيث وبتعريض عقل طرفية من نباتات الأراولا *Chrysanthemum morifolium* cv. Maghi لأشعة جاما بمقدار ١.٥- ٢.٥ كيلوراد طول موسم النمو تم الحصول على العديد من صور الكيميرا فى لون الأزهار وتبرقش الأوراق (شكل رقم ٧-٨). وكمحاولة لعزل هذا التباين فى صورة طفرات ثابتة قام (Mandal *et al.*, 2000) باستخدام تكنيك زراعة أنسجة أجزاء نباتية مختلفة من هذه النباتات معملياً. وبالفعل أمكن عزل طفرتين لتبرقش الأوراق وكذلك طفرات ذات ألوان جديدة استعملت كبداية لتكوين صنف جديد. ويبين شكل رقم (٧-٩) تأثير استعمال أجزاء نباتية مختلفة على عزل طفرات لونية من نبات الاراولا، وقد استخدمت نفس الطريقة للحصول على سلالات جديدة من قصب السكر. وفى حالات وإن كانت قليلة تتكون الكيميرا عند اشتراك نوعين مختلفين من الكالس فى تكوين الفرع كما فى الشكل رقم (٧-١٠).

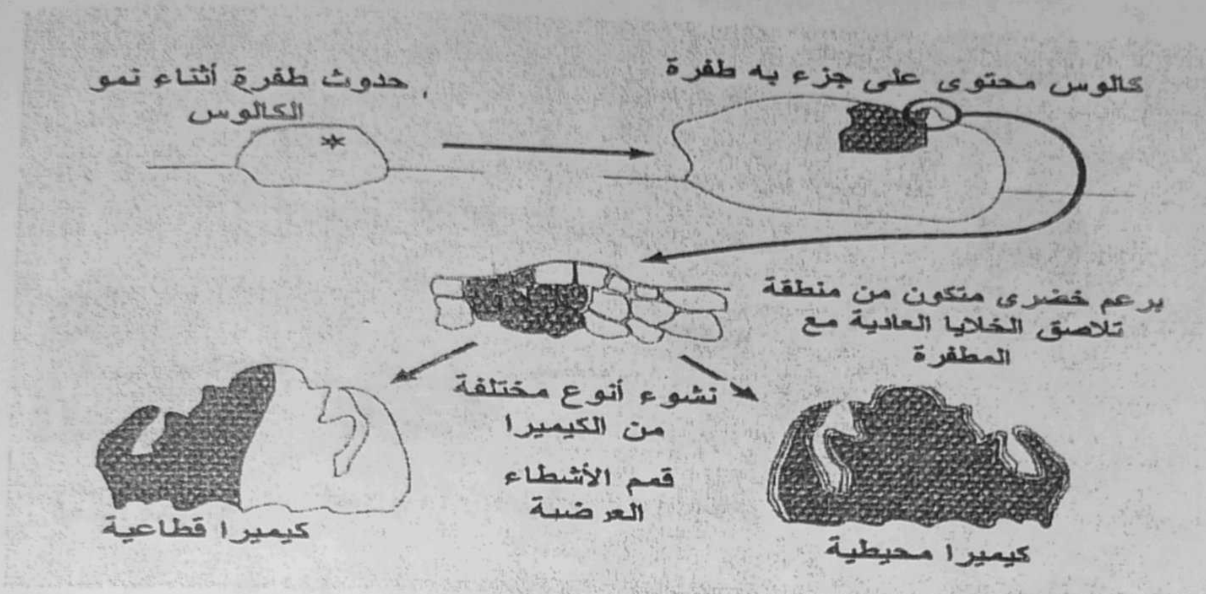
وتلعب العوامل البيئية أثناء الإكثار دوراً بارزاً فى ظهور الكيميرا أو اختفائها من النباتات المستولدة، فعند زراعة أنسجة نبات *Hosta decorata* لمدة طويلة داخل المعمل تكونت أفرع من براعم عرضية وبراعم جانبية، لكن فقدت النباتات الناتجة صفة التخطيط الموجودة بالأوراق، وأمكن استعادة تلك الصفة جزئيا بوضع النباتات الناتجة فى حجرة باردة حيث تكونت حافة بيضاء خلال ٤ أسابيع فى ٣٠% من النباتات وزادت هذه النسبة إلى ٥٠% بعد ١٢ أسبوع. ويرجع ذلك لدخول النباتات مرحلة البلوغ تدريجيا. أما اختفاء لون أوراق *Episcia* المتكشفة فى مزارع الأنسجة فيرجع إلى دخول النباتات مرحلة الصبا مرة أخرى (George, 1993).



شكل ٧ـ ٨: تكوين كيميرا جديدة فى الأفرع المتكشفة من خلط نوعين مختلفين من الكالس وربما من نوعين نباتيين مختلفين (George, 1993).



شكل ٧-٩: كيميرا لونية للنورة الزهرية فى نباتات الأراولا عقب المعاملة بأشعة جاما فى اليمين وفى اليسار كيميرا لتبرقش الأوراق (Mandal *et al.*, 2000).



شكل ٧-١٠: تكوين كيميرا بسبب وجود طفرة فى الكالس المستعمل للإكثار (George, 1993).

قائمة المراجع

Abdolmaleki P., Ghanati F., Sahebjamei H. & Sarvestani A.S. (2007) Peroxidase activity, lignification & promotion of cell death in tobacco cells exposed to static magnetic field. The Environmentalist, 27: 435-440.

Abreu-Tarazi M.F., Navarrete A.A., Andreote F.D., Almeida C.V., Tsai S.M. & Almeida M. (2009) Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated "axenic" pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 555-560.

Adkins S.W., Shiraishi T. & McComb J.A. (1990) Rice callus physiology-identification of volatile emissions and their effects on culture growth. *Physiologia Plantarum*, 78: 526-531.

Afaque Q., Koche V., Sharma P. & Mishra S.K. (2004) *In vitro* clonal propagation of neem (*Azadirachta indica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78: 281-284.

Afreen-Zobayed F., Zobayed S.M.A., Kubota C., Kozai T. & Hasegawa O. (2000) A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato.*Plant Science*, 157: 225-231.

Ahloowalia B.S & Prakash J. (2004) Physical components of tissue culture technology. In: Low Cost Options for Tissue Culture Technology in Developing Countries. Proceedings of a technical meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Held in Vienna, 26-30 August, 2002.

Ahmed K.Z., Aly M.K.A, Shadia K.A. & Kamel H.M. (2010) *In vitro* isolation, culture and plant regeneration from mature embryos of Egyptian Cumin (*Cuminum cyminum* L.). Minia 2nd Conf. Agric. & Environ. Sci., Minia, Egypt, March 22-25, 2010, pp. 447-456.

Ahmed M.B., Akhter M.S., Hossain M., Islam R., Choudhury T.A, Hannan M.M., Razvy M.A. & Ahmad I. (2007) An Efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with an aphidicidal gene, *Pta* (*Pinellia ternata* Agglutinin). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 2: 155-160.

Ahn I.O., Bui Le C.,Tran K. (1996) Direct somatic embryogenesis through thin cell layer culture in *Panax ginseng*.*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45: 237-243.

Al-Al-Mallah M., Davey M.R. & Cocking E.C. (1989) Formation of nodular structures on rice seedlings by *Rhizobia*. *Journal of Experimental Botany*, 40: 473-478.

Ali A., Naz S., Siddiqu F.A. & Iqbal J. (2008) An efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. *Pakstain Journal of Botany*, 40: 139-149.

Al-Juboory K.H., Skirvin R.M. & Williams D.J. (1998) Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia *Gardenia jasminoides* Ellis leaf explants. *Scientia Horticulturea*, 72: 171-178.

Al-Khayri J.M. & Al-Bahrany A.M. (2001) Silver nitrate and 2-isopentyladenine promote somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturea*, 89: 291-298.

Al-Khubary A.Y. (2008) Propagation of fig trees (cv. Brown turkey) by tissue culture technique. MSc. Thesis, King Saud University, Saudi Arabia.

Al-Qahtani A.M.R. & Alkhateeb A.A. (2008) Alternative to agar: effect of different growing media on *in vitro* production of somatic embryogenesis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. khalass. *Acta Horticulturea*, 779: 649-654.

Amoo S. O., Finnie J. F. & Van Staden J. (2009) Effects of temperature, photoperiod and culture vessel size on adventitious shoot production of *in vitro* propagated Huernia hystrix. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99: 233–238

Antoine A.F., Faure J., Cordeiro S., Dumas C., Rougier M. & Feijo J.A. (2000) A calcium influx is triggered and propagates in the zygote as a wavefront during *in vitro* fertilization of flowering plants. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 97: 10643-10648.

Arnholdt-Schmitt B. (1993) Rapid changes in amplification and methylation pattern of genomicDNA in cultured carrot root explants (*Daucus carota* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 793–800.

Arnison P.G., Donaldson P., Ho L.C.C. & Keller W.A. (1990) The influence of various physical parameters on anther culture of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20: 147-155.

Arnozis P.A., Nelemans J.A. & Findenegg G.R. (1988) Phosphoendpyruvate carboxylase activity in plants grown with either NO^-_3 or NH^+ as inorganic nitrogen source. *Journal of Plant Physiology*, 132: 23-27.

AroraR. (2003)Induction and release of bud dormancy in woody perennials, a sciencecomes of age. Hortscience, 38: 911-921.

Arrebola M.L., Socorro O. & Verpoorte R. (1997) Micropropagation of Isoplexis canariensis (L.) G. Don. Plant Cell, *Tissue and Organ Culture*, 49: 117–119.

Asao H., Arai S., Sato T. & Hirai M. (1994) Characteristics of a somatic hybrid between *Solanum melongena* L. and *Solanum sanitwongsei* Craib. *Breeding Science*, 44: 301-305.

Ascencio-Cabral A., Gutie´rrez-Pulido H., Rodrı´guez-Garay B. & Gutie´rrez-Mora A. (2008) Plant regeneration of *Carica papaya* L. through somatic embryogenesis in response to light quality, gelling agent and phloridzin. *Scientia Horticulturea*, 118: 155-160.

Aslam F.N., MacDonald M.V., Loudon P.T. & Ingram D.S. (1990) Rapid cycling *Brassica* species: inbreeding and selection of *Brassica napus* for anther culture ability and an assessment of its potential for microspore culture. *Annals of Botany*, 66: 331-339.

Atak C., Celik O., Olgun A., Alikamanoğlu S. & Rzakoulieva A. (2007) Effect of magnetic field on peroxidase activities of soybean tissue culture. *Biotechnology & Biotechnology Equipment*, 21: 166-171.

Avila A.D., Pereyra, S.M. & Argüello J.M. (1998) Nitrogen concentration and proportion of $NH4^+$-N affect potato cultivar response in solid and liquid media. *HortScience*, 33: 336-338.

Azadi P. &Khosh-Khui M. (2007) Micropropagation of*Lilium ledebourii*(Baker) Boiss as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments. *Electronic Journal of Biotechnology*, DOI:10.2225/vol10-issue4-fulltext-7.

Azadi P. (2007) Micropropagation of *Lilium ledebourii* (Baker) as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments.*Electronic Journal of Biotechnoogy*,10: 582-591.

Azcon-Aguilar C., Padilla I.G., Encina C.L., Azcon R. & Barea J.M. (1996) Mycorrhizal inoculation (Glomus deserticola) enhances plant growth and changes root system morphology in microprapagaed *Annona cherimola* Mill, Novel Biotechnological Approaches to Plant Production: From Sterile Root to Mycorrhizosphere. Joint COST Meeting 8.21 Pisa, Italy, pp 21.

Baba A., Hasezawa S. &Syōno K. (1986) Cultivation of Rice Protoplasts and Their Transformation Mediated by Agrobacterium Spheroplasts.*Plant and Cell Physiology*, 27: 463-471.

Bach A. (1987) The capability of *in vitro* regeneration of various cultivars of *Freesia hybrida*. *Acta Horticulturae*, 212: 715- 718.

Bais H.P. & Ravishankar G.A. (2002) Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 1-34.

Bais H.P., Sudha G. & Ravishankar G.A. (2000) Putrescine and silver nitrate influence shoot multiplication, *in vitro* flowering and endogenous titers of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local. *Journal Plant Growth Regulation*, 19: 238-248.

Bajaj Y.P.S. (1992) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 20: High-Tech. and Micropropagation IV: Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Baker D.A. (2000) Vascular transport of auxins and cytokinins in *Ricinus*. *Plant Growth Regulation*, 32: 157-160.

Ballester M.C., San-Jose Vidal N., Ndez-Lorenzo J.L. & Vieitez A.M. (1999) Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. *Annals of Botany*, 83: 619-629.

Baraldi R., Rossi F. & Lercari B. (1988) *In vitro* shoot development of *Prunus* GF655-2: interaction between light and benzyladenine. *Physiolgia Plantarum*, 74: 440-443.

Baran J.T. & Biswajit G. (2005) Plant Tissue Culture "Basic and Applied" Universities Press, India.

Barciszewski J., Siboska G., Rattan S.I.S. & Clark B.F.C. (2000) Occurrence, biosynthesis and properties of kinetin (N6-furfuryladenine). *Plant Growth Regulation*, 32: 257-265.

Barwale U.B., Kerns H.R. & Widholm J.M. (1986) Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes *via* embryogenesis and organogenesis. *Planta*, 167: 473-481.

Bauer N., Levani D.L., Mihaljevi S. & Jelaska S. (2002) Genetic Transformation of *Coleus blumei* Benth. Using *Agrobacterium*. *Food Technology and Biotechnology*, 40: 163–169.

Benbadis A. & de Virville J.D. (1982) Effects of polyethylene glycol treatment used for protoplast fusion and organelle transplantation on the functional and structural integrity of mitochondira isolated from spinach leaves. *Plant Science Letter*, 26: 257-264.

Bennett I.J., McDavid D.J.A. & McComb A.J. (2003) The influence of ammonium nitrate, pH and indole butyric acid on root induction and survival in soil of micropropagated *Eucalyptus globulus*. *Biologia Plantarum*, 47: 355-360.

Bennici A., Grifoni T., Schiff S. & Bovelli R. (1997) Studies on callus growth and morphogenesis in several species and lines of *Amaranthus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culuture*, 49: 29-33.

Bertos B. Kojic´-Prodic B., Wade R.C. & Tomic S. (2008) Mechanism of auxin interaction with auxin binding protein (ABP1): A Molecular Dynamics Simulation Study. *Biophysical Journal*, 94: 27-37.

Beruto M., Curir P. & Debergh P. (1999) Influence of agar on *in vitro* cultures II. Biological performance of *Ranunculus* on media solidified with three different agar brands. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 35: 94-101.

Bhatia N.P., Bhatia P. & Ashwath N. (2002) *Ex vitro* rooting of micropropagated shoots of *Stackhousia tryonii*. *Biologia Plantarum*, 45: 441-444.

Bhatia P. & Ashwath N. (2005) Effect of medium pH on shoot regeneration from the cotyledonary explants of tomato. *Biotechnology*, 4:7-10.

Bhatia P., Ashwatha N. & Midmore D.J. (2005) Effects of genotype, explant orientation, and wounding on shoot regeneration in tomato.*In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 41: 457-464.

Bhau B.S. & Wakhlu A.K. (2001) Effect of some antibiotics on the *in vitro* morphogenetic response from callus cultures of *Coryphantha Elephantidens*. *Biologia Plantarum*, 44: 19-24.

Bhojwani S.S. & Razdan M.K. (1996) Plant Tissue Culture: Theory and Practice. 2nd Edn Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, The Netherlands.

Binns A. & Meins F.Jr. (1980) Chromosome number and the degree of cytokinin habituation of cultured tobacco pith cells. *Protoplasma*, 103: 179– 187.

Bister-Miel F., Guignard J.L., Bury M. & Agier C. (1985) Glutamine as an active component of casein hydrolysate: its balancing effect on plant cells cultured in phosphorus deficient medium. *Plant Cell Reports*, 4: 161-163.

Blakesley D. & Lenton J.R. (1987) Cytokinin uptake and metabolism in relation to shoot multiplication *in vitro*. In: Jackson M.B., Mantell S.H. & Blake J. (Eds.) Advances in the Chemical Manipulation of Plant Tissue Cultures. Monograph 16, British Plant Growth Regulator Group, Bristol.

Blanco M.D.A., Nieves N., Sanchez M., Borroto C.G., Castillo R., Gonzalez J.L., Escalona M., E.Baez & Z. Hernandez (1997) Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Cell Tisue and Organ Culture*, 51: 153-158.

Bolandi A.R., Branchard M., Alibert G., Serieys H. & Sarrafi A. (1999) Cytoplasmic-nuclear interaction and medium effect for protoplast culture in sunflower. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57: 189-193.

Bouman H. & Tiekstra A. (2005) Adaptations of the mineral composition of tissue culture media on the basis of plant elemental analysis and composition of hydroponic substrates. In: Hvoslef-Eide A.K. & Preil W. (Eds.) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Springer-Verlag, Berlin, Germany, Dordrecht. pp 493-505.

Bozhkov P.V., Filonova L.H. & Von Arnold S. (2002) A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. *Biotechnology and Bioengineering*, 77: 658-667.

Bredmose N., Hansen J. & Nielsen J. (1999) Factors intrinsic to the axillary bud determine topophysic effects on bud and shoot growth and flower development in rosa hybrida.*International Journal ofPlant Science*, 160: 819-825.

Bressan P.H., Kim Y.-J., Hydman S.E., Hasegawa P.M. & Bressan R.A. (1982) Factors affecting *in vitro* propagation of rose. *American Society for Horticultural Science*, 107: 979-990.

Burge G. K., Morgan E. R. & Seelye J.F. (2002) Opportunities for synthetic plant chimeral breeding: Past and future. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,70: 13-21.

Burritt D.J. & Leung D.W.M. (2003) Adventitious shoot regeneration from *Begonia erythrophylla* petiole sections is developmentally sensitive to light quality. *Physiologia Plantarum*, 118: 289--296.

Capitani F. & Altamura M.M. (2004) Exogenous calcium enhances the formation of vegetative buds, flowers and roots in tobacco pith explants cultured in the absence of exogenous hormones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77: 1-10.

Carelli BP, Echeverrigaray S. (2002) An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. *Scientia Horticulturea*, 92: 69--74.

Carlson P.S. & Chaleff R.S. (1974). Heterogeneous association of cells formed *In vitro*. In: L. Ledoux (Ed.), Genetic Manipulations with Plant Materials. Plenum Press, New York, USA. pp 245--261.

Carlson P.S., Smith H.H. & Dearing R.D. (1972) Parasexual interspecific plant hybridization. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA. 69: 2292-2294.

Carman J.G. & Campbell W.A. (1988) Factors affecting somatic embryogenesis in wheat. In Bajaj Y.P.S. (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Crops II*. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Cassells A.C., Minas G. & Long R. (1980) Culture of *Pelargonium* hybrids from meristems and explants: Chimeral and beneficially-infected varieties. In: D.S. Ingram & J.P. Helgeson (Eds.), Tissue Culture Methods for Plant Pathologists. Blackwell, Oxford, pp 125-130.

Celenza J., Grisafi P. & Fink G. (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana.Cenes & Development*, 9: 2131-2142.

Celestino C., Luisa M., Toribio M., Antonio J.A. & Bardasano J. (1998) Influence of 50 Hz electromagnetic fields on recurrent embryogenesis and germination of cork oak somatic embryo. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54: 65-69.

Chabukswar M.M. & Deodhar M.A. (2006) Restoration of rooting competence in a mature plant of Garcinia indica through serial shoot tip grafting *in vitro*. *Scientia Horticulturea*, 108: 194-199.

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W. & Prasher D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263: 802–80.

Chandler S.F. & Dodds J.H (1983) The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasidine in callus cultures of *Solanum laciniatum*. *Plant Cell Report*, 2: 105–108.

Chandra S., Bandopadhyay R., Kumar V. & Chandra R. (2010) Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, 32:1199–1205.

Charriere F., Sotta B., Miginiac E. & Hahne G. (1999) Induction of adventitious shoots or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiology & Biochemistery*, 37: 751-757.

Chawla H.S. (2000) Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers, Inc, USA.

Chazen O., Hartung W. & Neumann P.M. (1995) The different effects of PEG 6000 and NaCl on leaf development are associated with differential inhibition of root water transport. *Plant, Cell & Environment*, 18: 727-735.

Chen C. (2005) Fluorescent lighting distribution for plant micropropagation.*Biosystems Engineering*, 90: 295–306.

Chen J. T. & Chang W.C. (2003) 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid enhanced direct somatic embryogenesis from *Oncidium* leaf cultures. *Biologia Plantarum*, 46: 455-458.

Chen Z., Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V. & Sondahl M.R. (1990) Handbook of Plant Cell Culture Vol. 6. Perennial Crops.McGraw-Hill Publishing Company, New York, USA.

Cheong, E.J. & Pooler, M.R. (2004) Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus incisa* cv. February Pink. *Plant Cell Reports*, 11: 810-815.

Choffe K.I., Victor J.M.R., Murch S.J. & Saxena K. (2000) *In vitro* regeneration of *Echinacea purpurea* l.: Direct somatic embryogenesis and indirect shoot organogenesis in petiole culture. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 36: 30-36.

Chu C. (1978) The N 6 medium and its application to anther culture of cereal crops. In: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Peking, Beijing, China. pp. 43-50.

Chueca M.C., Cauderon Y. & Tempe J. (1977) Technique d'obtention d'hybrids Ble tendre X Aegilops par culture *in vitro* d'embryons immatures. Annual Amelior Plant, 27: 539-547.

Clayton D., Gilmar Z.R. & Miguel G.P. (2003) Effect of hotosynthetically active radiation on the *in vitro* initial development of banana cultures. *Agrociência*, 9: 175-176.

Cleland R.E. (2004) Auxin and cell elongation. In: Davies P.J. (Ed.) Plant Hormones, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 204-220

Cocking E.C. (1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 187: 962-963.

Collin H.A. & Edwards S. (1998) Plant Cell Culture. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK.

Cooke T.T., Poli D.B., Szetien A.E. & Cohen J.D. (2002) Evolutionary pattern in auxin action. *Plant Molecular Biology*, 49: 319-338.

Córdoba-Sellés M., García-Rández A., Alfaro-Fernández A.& Jordá-Gutiérrez C. (2007) Seed transmission of pepino mosaic virus and efficacy of tomato seed disinfection treatments. *Plant Disease*, 91: 1250-1254.

Costa M.G.C., Nogueira F.T.S., Figueira M.L., Otoni W.C., Brommonschenkel S.H. & Cecon P.R. (2000) Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Plant Cell Reports*, 19: 327-332.

Cou'ee I., Hummel I., Sulmon C., Gouesbet G. & El-Amrani A. (2004)Involvement of polyamines in root development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 1-10.

D'Amato F., Bennici A., Cionini P.G., Baroncelli S. & Lupi M.C. (1980) Nuclear fragmentation followed by mitosis as mechanism for wide chromosome number variation in tissue cultures, its implications for plant regeneration. In: Sala F., Parisi B., Cella R., Ciferri O. (eds) Plant Cell Cultures: Results and Perspectives. Elsevier North Holland, Amsterdam, The Netherlands. pp 67–72.

Dale P.J. & Cheyne V.A (1993) The elimination of clover diseases by shoot tip culture. *Annals of Applied Biology*, 123: 25-32.

Dan Y. (2008) Biological functions of antioxidants in plant transformation.*In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 44: 149-161.

Dang R. & Donnelly D.J.N (1993) *In vitro* hardening of new raspberry by CO_2 enrichment and reduced medium sucrose concentration. *Horticultural Science*, 281: 1048-1051.

Danso K.E. & Ford-Lloyd B.V. (2003) Encapsulation of nodal cuttings and shoot tips for storage and exchange of cassava germplasm *Plant Cell Reports*, 21: 718–725.

Datta S.K., Peterhans A., Datta K. & Potrykus I. (1990) Genetically engineered fertile Indica-rice recovered from protoplasts. *Bio/Technology*, 8: 736-740.

Davey M.R., Anthony P., Power J.B., Lowe K.C. (2005) Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 23: 131-171.

Davies P.J. (1995) Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, 2nd. ed., Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Nethrelands.

Davies P.J. (2004) Plant Hormones: Their Nature, Occurrence and Function. In: Davies P.J (Ed.) Plant Hormones, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp 1-15.

Davies P.J. (2004b) Regulatory factors in hormone action: Level, location and signal transduction. In: Davies P.J. (ed.) Plant Hormones, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Nethrelands. pp 16-35.

De Klerk G.J. & Wijnhoven F. (2005) Water retention capacity of tissue cultured plants. *Propgation of Ornamental Plants*, 5: 14-18.

De Klerk G.J., Hanecak ova J. & Jásik J. (2008) Effect of medium-pH and MES on adventitious root formation from stem disks of apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95: 285-292.

De Klerk G.J.M. & Calamar A. (2002) Effect of sucrose on adventitious root regeneration in apple.*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70: 207-212.

De Klerk G.J.M. & Calamar A. (2002) Effect of sucrose on adventitious root regeneration inapple.*Plant Cell Tissue Organ Culture*, 70: 207-212.

De La Pena A., Lorz H. & Schell J. (1987) Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers. *Nature*, 325:274-276.

De Riek L., Piqueras A. & Debergh P.C. (1997) Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagation of *Rosa multiflora* Jan. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 269-278.

De Schepper S., Leus L., Eeckhaut T., Van Bockstaele E., Debergh P. & De Loose M. (2004) Somatic polyploid petals: regeneration offers new roads for breeding Belgian pot azaleas. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 183–188.

Debergh P. & Maene L. (1981) Some aspects of stock-plant preparation for tissue culture propagation. *Acta Horticulturae*, 166: 21-23.

Debergh P.C. & Read P.E. (1991) Micropropagation. In: Debergh P.C. & Zimmer- man R.H. (Eds) Micropropagation. Kluwer Academic Publsher.The Netherlands. pp. 1–13.

DeCook R., Lall S., Nettleton D. & Howell S. (2006) Genetic Regulation of Gene Expression During Shoot Development in Arabidopsis. *Genetics*, 172: 1155-1164.

DeKlerk G-J. (2002) Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 38: 415- 422.

Delaat M.M. & Blaas J. (1987) An improved method for protoplast micro-injection suitable for transfer of entire plant chromosomes. *Plant Science*,50: 161-169DeLaat.A.M. & Blaas J. (1987) cytoplasmic organelles intoplant protoplasts.*Plant Sciences*, 50: 161-169.

Delamomarco J.B. & Picazo I. (1994) Effect of growth regulators on *in vitro* propagation of *Ficus benjamina* cv. Exotica. *Biologia Plantarum*, 36: 167-173.

Dewitte W., Riou-Khamlichi C., Scofield S., Healy J.M.S., Jac-qmard A., Kilby N.J. & Murray J.A.H. (2003) Altered cell cy-cle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in Arabi-dopsis caused by the D-type cyclin CYCD3. Plant Cell,15: 79-92.

Dhawan V. & Saxena S. (2005) Cloning Forestry Species. In: Plant Biotechnology and Molecular Markers. Srivastava P.S., Narula A. & Srivastava S. (Eds.) Anamaya Publishers, New Delhi, India. pp 183-194.

Dickinson J.R., Forsyth1 C. & Van Staden1 J. (1986) The role of adenine in the synthesis of cytokinins in tomato plants and in cell-free root extracts. *Plant Growth Regulation*, 4: 325-334.

Dimassi K., Chouliaras V., Diamantidis G. & Therios I. (2003) Effect of iron and auxins on peroxidase activity and rooting performance of three citrus rootstocks *in vitro*. *Journal of Plant Nutration*, 26: 1023-1034.

Dix P.J. (1990) Plant Cell Line Selection. VCH, Weinheim, Holland.

Dixon R.A. & Gonzales R.A. (1994) Plant Cell Culture A Practical Approach 2nd edn. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo.

Dixon R.R. (1985) Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: Dixon, R.A. (Ed.) Plant cell culture: a practical approach. Oxford: Irl Press. pp 1-20.

Dodeman V.L., Ducreux G. & Kreis M. (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48: 1493-1509.

Donnelly D.J., Coleman W.K. & Coleman S.E. (2003) Potato microtuber production and performance: A review. *American Journal of Potato Research*, 80:103-115.

Druart P.H. (1988) Regulation of axillary branching in micropropagation of woody fruit species.*Acta Horticulturae*, 227: 369-380.

Duncan R.R. (1997) Tissue culture-induced variation and crop improvement.*Advances in Agronomy*, 58: 201-240

Economou A.S. & Read P.E. (1987) Light treatments to improve efficiency on *in vitro* propagation systems.*HortScience*, 22: 751–753.

Emek Y. & Erdag B. (2007) *In vitro* propagation of *Gladiolus anatolicus* (Boiss) Stapf.*Pakistan Journal of Botany*, 39: 23-30.

Emons A.M.C., Samallo-Droppers A. & Van Der Toorn C. (1993) The influence of sucrose, mannitol, L-proline, abscisic acid and gibberellic acid on the maturation of somatic embryos of *Zea mays* L. from suspension cultures. *Journal of Plant Physiology*, 142: 597-604.

Engelmann F. & Engels J.M.M. (2002) Technologies and strategies for ex situ conservation. In: Engels, J.M.M., Rao R.V, Brown, A.H.D. & Jackson, M.T. (Eds.) Managing Plant Genetic Diversity. Wallingford and Rome, CAB International and IPGRI. pp 89-104.

Enjalric F., Carron M.P. & Lardet L. (1988) Contamination of primary cultures in tropical areas: The case of Hevea Brasiliensis. In: Bacterial and bacteria-like contaminants of plant tissue cultures. ISHS Acta Horticulturae 225 http://www.actahort.org/books/225/index.Htm.

Estrada-Luna A.A., Davies F.T. & Egilla J.N. (2000) Mycorrhizal fungi enhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (Psidium gualava L.) during ex vitro acclimatization and plant establishment. Mycorrhiza, 10: 1-8

Etienne H. & Berthouly M. (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation.*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 215-231.

Eymar E., Alegre J., Toribio M. & L´opez-Vela D. (2000) Effect of activated charcoal and 6-benzyladenine on *in vitro* nitrogen uptake by *Lagerstroemia indica. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 63: 57-65.

Fal M.A., Majada J.P., Gonz´alez A. & S´anchez R.T. (1999) Differences between *Dianthus caryophyllus* L. cultivar in *in vitro* growth and morphogenesis are related to their ethylene production. *Plant Growth Regulation,* 27: 131-136.

Faure J-E. (2001)Double fertilization in flowering plants: Discovery, study methods and mechanisms C.R. *Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences* 324: 551-558.

Feher A., Pasternak T., Otvos K., Miskolczi P. & Dudits D. (2002) Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: A review. *Biologia*, 57: 5-12.

Feher A., Pasternak T.P. & Dudits D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 201-228.

Felle H.H. (2001) pH: Signal and messenger in plant cells. *Plant Biology*, 3: 577-591.

Fonnesbech A., Fonnesbech M. & Bredmose N. (1979) Influence of cytokinins and temperature on development of *Asparagus plumosus* shoot tips *in vitro*. *Physiologia Plantarum*. 45: 73-76

Francis D. & Sorrell D.A. (2001) The interface between the cell cycle and plant growth regulators: A mini review. *Plant Growth Regulation*, 33: 1-12.

Friml J. (2003) Auxin transport – shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 1-6.

Fujiwara K., Kozai T. & Nakajo Y. (1989) Effects of closures & vessels on light intensities in plant tissue culture vessels. *Journal of Agricultural Meteorology*, 45: 143–149.

Funada R., Kubo T., Tabuchi M., Sugiyama T. & Fushitani M. (2001) Seasonal variations in endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in the cambial region of Pinus densiflora Sieb. et Zucc. stems in relation to earlywood/latewood transition and cessation of tracheid production. *Holzforschung*, 55: 128-134.

Furner I.J., King J. & Gamborg O.L., (1978) Plant regeneration from protoplasts isolated from a predominantly haploid suspension culture of *Datura innoxia* (Mill). *Plant Science Letter*, 11: 169-176.

Gahan P.B. & George E.F. (2008) Adventitious Regeneration. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology, 3rd Edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 355-402.

Gamborg O. L. (2002) Plant tissue culture.Biotechnology.Milestones.*In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 38: 84–92.

Gamborg O.L., Miller R.A. & Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158.

Ganapthi T.R., Srinivas L., Supranna P. & Bapat V.A. (2001) Regeneration of plants from alginate – encapsulated somatic embryos of banana cv. Rasthali (*Musa* s pp AAB group). *In vitro Cellular and Developmental Biology--Plant*, 37: 178-181.

Garcia-Luis A., Molina R.V., Varona V., Castello S. & Guardiola J.L. (2006) The influence of explant orientation and contact with the medium on the pathway of shoot regeneration *in vitro* in epicotyl cuttings of *Troyer citrange*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 85: 137--144.

Gavazzi G.C., TonelliG., TodescoE., ArreghiniF., RaffaldiF., VecchioG., BarbuzziM.G.& Sala F. (1987) Somaclonal variation versus chemically induced mutagenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 74: 733-738.

Geier T. (1986) Factors affecting plant regeneration from leaf segments of Anthurium scherzerianum Schott (Araceae) cultured *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 6: 115-125.

Gemas V. & Bessa A. (2006) Influence of various carbohydrates in shoot development in nodal culture of Guinean Anacardium occidentale genotypes. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 85: 103-108.

George E.F. & Davies W. (2008) Effects of the Physical Environment. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 423-469.

George E.F. & De Klerk G-J. (2008) The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology, 3rd edn.Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 65-114.

George E.F. & Debergh P.C. (2008) Micropropagation: Uses and Methods. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 29-64.

George E.F. (1993) Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology, 2nd edn. Exegetics limited, UK.George E.F. (2008) Plant Tissue Culture Procedure - Background. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 1-29.

Gerendas J., Polacco J.C., Freyeremuth S.K. & Sattelmacher B. (1999) Significance of nickel for plant growth and metabolism.*Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 162: 241-256.

Gertsson U.E. (1988) Influence of macronutrient composition, TIBA and dark treatment on shoot formation and nitrogencontent in petiole explants of *Seneciohybridus Journal of Horticultural Science,* 63: 497-502.

Gislerod H.R., Selliah R., Ayeh K.Q. & Hvoslef-Eide A.N.(2005) Macro- and micronutrient nutrition of plants in greenhouses, hydroponic systems, and *in vitro* culture on gelled media. In: Kathrine A., Hvoslef-Eide & Preil W. (Eds.) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Springer-Verlag, Berlin, Germany-Verlag, Germany. pp. 475-492.

Godfrey J. & Cross R. (2005) Photoautotrophic micropropagation of Banksia final Report to the Australian Flora Foundation, http://www.aff.org.au/Cross_Banksia_final.pdf

Goodman E.M., Greenebaum B. & Morron T.M. (1995) Effects of electromagnetic fields on molecules and cells. *Intrnational Review of Cytology*, 158: 279-325.

Grimes H.D. & Hodges T.K. (1990) The inorganic NO^-_3/NH^+_4 ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of Indica rice (*Oryzasativa* L.). *Journal of Plant Physiology*, 136: 362-367.

Grout B.W.W. (1988) Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and the stresses of transplanting. *Acta Horticulturae*, 230: 129-135.

Grout B.W.W. (1999)Meristem-tip culture for propagation and virus elimination. In: Hall R D (Ed.): Methods in Molecular Biology, Plant Cell Culture Protocols. Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA.

Guan H.Y., Huisman P. & De Klerk, G.-J. (1997) Rooting of apple stem slices *in vitro* is affected by indoleacetic-acid depletion of the medium. *Angewandte Botanik*, 71: 80-84.

Gunson H.E. & Spencer-Phillips P.T.N. (1994) Latent bacterial infections: Epiphytes and endophytes as contaminants of micropropagated plants. In: Lumsden P.J., Nicholas J.R. & Davies W.J. (Eds.) Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. Kluwer, Dordrecht, Germany. pp 379-396.

Gürel S., Gürel E. & Kaya Z. (2002) Protoplast fusion in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Turkish Journal of Biology*, 26: 163-170.

Hall R.D. (1999) An introductron to plant-cell culture: pointers to success. *In:* Hall R.D. (Ed.) Plant Cell Culture Protocols. Humana Press, Ottowa, NJ, USA. pp 1-19.

Hao Y.J. & Deng X.X. (2002) Stress treatments and DNA methylation affect somatic embryogenesis from citrus callus. *Acta Botanica Sinica*, 44: 673-677.

Harris R. & Mason E. (1983) Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. *Canadian Journal of Plant Science*, 63: 311-316.

Harry I.S. & Thorpe T.A. (1990) Clonal Propagation of Woody Species. In: Hall R.D. (Ed.) Methods in Molecular Biology, Plant Cell Culture Protocols. Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA. pp 149-158.

Hart J.W. (1988) Light and Plant Growth. Unwin Hyman, London, UK.

Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T. & Geneve R.L. (2002)Plant Propagation Principles and Practices.7th. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.

Hartung W. & Abou-Mandour A.A. (1996) A beneficial role of abscisic acid for regenerates of *Ruta graveolens* ssp *divaricata* (Tenore) Gams suffering from transplant shock. *J. Appl. Bot.-Angewandte Botanik*, 70: 221-223.

Hazarika B. N. (2003) Acclimatization of tissue-cultured plants.Current Science, 85: 12-25

Hazarika B.N. (2006) Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants.Scientia Horticulturea,108: 105–120

Heinz D.J. & Mee G.W.P. (1971) Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in Saccharum species hybrid clones derived from callus tissue. *American Journal of Botany*, 58: 257-262.

Heller R. (1953) Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultives in vitro.*Ann. Sci. Natl. Biol. Veg.*, 14: 1-223.

Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y., Kanda M. (1996) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 7783–7788.

Hirota N., Nakagawa J & Kitazawa K. (1999) Effects of a magnetic field on the germination of plants. *Journal of Applied Physics*, 85: 5717–5719.

Holdgate D.P. (1977) Propagation of ornamentals by tissue culture. In: Reinert J. & Bajaj Y.P.S. (Eds.) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 18-43

Homffann K., Verbeek M., Romano A., Dullemans A.M., vanden Heuvel J.F.J.M. & van der Wilk F. (2001) Mechanicaltransmission of poleroviruses. *Journal of Virological Methods*, 91:197–201.

Hoque A. & Arima S. (2002) Overcoming phenolic accumulation during callus induction and *in vitro* organogenesis in water chestnut (*Trapa japonica* Flerov). *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant,* 38: 342-346.

Hossain B., Hirata N., Nagatomo Y., Akashi R. & Takaki H. (1997) Internal zinc accumulation is correlated with increased growth in rice suspension culture. *Journal of Plant Growth Regulation,* 16: 239-24.

Huang L-C., Lius S., Huang B-L., Murashige T., Mahdi E.M. & Van Gundy R. (1992) Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by Repeated Grafting of Shoot Tips onto Juvenile Rootstocks *in vitro*, model for phase reversal of trees. *Plant Physiology,* 98: 166-173.

Huetteman C.A. & Preece J.E. (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 33: 105-119.

Isac V. (2008) Research on ex vitro rooting of raspberry microcuttings obtained from *in vitro* micropropagation. *Lucrări ştiinţifice.* U.Ş.A.M.V.B., Seria B, vol. LI, 339-343.

Islam Md.T., Philibert D.D. & Keller E.R.J. (2005) Influence of explant, temperature and different culture vessels on *in vitro* cultüre for germplasm maintenance of four mint accessions *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81: 123-130.

Ivanova M. & Van Staden J. (2010) Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans *Plant Growth Regulation*, 60: 143–150.

Jackson J.A. & Dale P.J. (1988) Callus induction, plant regeneration and an assessment of cytological variation in regenerated plants of *Lolium multiflorum L. Journal of Plant Physiology*, 132: 351-355.

Jackson M.B. (2003) Aeration stress in plant tissue cultures. *Bulg. Journal of Plant Physiology*, Special Issue 2003: 96–109.

JacksoN M.B., Saker L.R., Crisp C.M., Else M.A. &Janowiak F. (2003) Ionic and pH signalling from roots toshoots of flooded tomato plants in relation to stomatal closure. *Plant and Soil*, 253: 103-113.

Jain N. & Barbbar S.B. (2002) Gum katira a cheap gelling agent for plant tissue culture media. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 71: 223-229.

Jain S.M. (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement.*Euphytica,* 118: 153-166.

Jaizme-Vega M.C., Rodriguez-Rovero A.S., Marin Hermoso C. & Declerck S. (2003) Growth of micropropagated bananas colonized by root-organ culture produced arbuscular mycorrhizal fungi entrapped in Ca-alginate beads, *Plant and Soil,* 254: 329–335.

Jambhale N.D., Patil S.C., Jadhav A.S., Pawar S.V. & Waghmode B.D. (2001)Effect of number of subcultures on *in vitro* multiplication of four banana clones.*Infomusa,* 10: 138–39.

James C. (2015) Preview: Global Status of CommercializedTransgenic Crops. ISAAA Briefs 30, ISAAA: Ithaca, NY. USA.

Jayasankar S. (2005)Variation in Tissue Culture. In: Trigiano R.N. & Gray D.J. (Eds) Plant Development and Biotechnology. CRC Press Boca Raton, Florida, USA.pp 301- 311.

Jensen C.J. (1974) Chromosome doubling techniques in haploids. In: Kasha K.J. (Ed) Haploids in higher plants: advances and potential. University of Guelph Press, Guelph, Ontario, Canada. pp 153–193.

Jensen C.J. (1986) Haploid induction and production in crop plants. In: de Gryuyter Horn W. (Ed.) Genetic Manipulation in Plant Breeding. Proc. Int. Symp. EUCARPIA, Sept. 8-13, 1985, Berlin, Germany. Berlin - New York.

Jeong B.R., Fujiwara K. and Kozai T. (1995) Environmental control and photoautotrophic micropropagation. *Horticultural Reviews*, 17: 125-172.

Jheng F.Y., Do Y.Y., Liauh Y.W., Chung J.P. & Huang P.L. (2006) Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of Oncidium 'Gower Ramsey' by adjusting carbohydrate sources.*Plant Science*, 170: 1133–1140.

Jime´nez V.M., Castillo J., Tavares E., Guevara E. & Montiel M. (2006) *In vitro* propagation of the neotropical giant bamboo, *Guadua angustifolia* Kunth, through axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 389-395.

Jimenez V.M. & Bangerth F. (2001) Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot.*Physiologia Plantarum*, 111: 389-395.

Johansson L.B., Calleberg E., Gedin A. (1990) Correlations between activated charcoal, Fe-EDTA and other organic media ingredients in cultured anthers of *Anemone canadensis*. *Physiologia Plantarum*, 80: 243–9.

Johnson A. & Veilleux R. (2001) Somatic hybridization and application in plant breeding. In: J. Janick (Ed.) Plant breeding reviews, vol. 20. John Wiley & Sons, Inc. pp 167-225.

Jones E.D. (1988) A current assessment of *In vitro* culture and other rapid multiplication methods in North America and Europe.*American Potato Journal*, 65: 209-220.

Jones L. (1991) Biotechnological Innovations in Crop Improvement.Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, UK.

Jones M.G.K., Dunckley R., Steele S., Karp A., Gibson R., Fish N., Valkonen J., Poutala T. & Pehu F. (1990) Transfer of resistance to PLRV, PVX and PVY from *S. brevidens* to potato by somatic hybridization: characterisation and field evaluation. In: Nijkamp H.J.J (Ed.), Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands. pp 286-292.

Joyce S.M & Cassells A.C. (2002) Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation.*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70: 125-137.

Kadleček P., Tichá I., Čapková V. & Schäfer C. (1998) Acclimatization of micropropagated tobacco plantlets. In: Garab G. (Ed.): Photosynthesis: Mechanisms and Effects. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht - Boston - London Vol. V. pp 3853-3856.

Kaeppler S.M., Kaeppler H.F., Rhee Y. (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants.*Plant Molecular Biology*, 43: 179–188.

Kameya T. & Hinata K. (1970) Induction of haploid plants from pollen grains of Brassica. *Japanese journal of breeding*, 20: 82- 87.

Kao K.N. & Michayluk M.R. (1974) A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts.*Planta*, 115: 355-367.

Kaparakis G. & Alderson P.G. (2002) Influence of high concentration of cytokinins on the production of somatic embryo by germination seeds of tomato, aubergine and pepper. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 77: 186-190.

Kaparakis G. & Alderson P.G. (2003) Differential callus type formation by auxins and cytokinin in *in vitro* cultures of pepper (*Capsicum annuum* L.).*Plant Biosystems*, 137: 275-280.

Kapoor R., Sharma D. & Bhatnagar A.K. (2008) Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulturea*, 116: 227-239.

Karam N.S. & Al-Majathoub M. (2000) Direct shoot regeneration and microtuberization in wild *Cyclamen persicum* Mill. using seedling tissue. *Scientia Horticulturea*, 86: 235-246.

Kartsonas E. & Papafotiou M. (2007) Mother plant age and seasonal influence on *in vitro* propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90:111-116.

Keller W.A. & Armstrong K.C. (1977) Embryogenesis and plant regeneration in Brassica napus anther cultures.*Canadian Journal of Botany*, 55: 1383-1388.

Keskitalo M., Pohto A., Savela M.L. Valkonen J.P.T. Simon J. & Pehu E. (1998) Alterations in growth of tissue-cultured tansy (*Tanacetum vulgare* L.) treated with antibiotics. *Annals of Applied Biology*, 133: 281-296.

Kevers C., Gaspar T. & Demmes J. (2002) The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70: 181-188.

Keyes G.J., Deaton W.R., Collins G.B. & Legg P.D. (1981) Hybrid vigour in callus tissue cultures and seedlings of *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Heredity*, 72: 172-174.

Kintzios S., Drossopoulos J.B., Shortsianitis E. & Peppes D. (2000) Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.): effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. *Scientia Horticulturea*, 85: 137-144.

Kintzios S., Stavropoulou E. & Skamneli S. (2004) Accumulation of selected macronutrients and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of *in vitro* dedifferentiation and differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis). *Plant Scince*, 167: 655-664.

Kirkham M.B. & Holder P.L. (1981) Water osmotic and turgor potentials of kinetin-treated callus.*HortScience*, 16: 306-307.

Kitaya Y., Fukuda O., Kozai T. & Kirdmanee C. (1995) Effects of light intensity and lighting direction on the photoautotrophic growth and morphology of potato plantlets *in vitro*.*Scientia Horticulturae*, 62: 15-24.

Kitto S.K. & Janick J. (1982) Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos.*HortScience*, 17: 488.

Kitzinger E.M., Jansen Van Vuuren R., Woodwar B., Rong I.H., Spreth M.H. & Slabbert M.M. (1997) Elimination of external and internal contaminants in rhizomes of *Zantedeschia aethiopica* with commercial fungicides and antibiotics. In: Cassells, A.C. (Ed.) Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands. pp 61-167.

Klapheck S., Grosse W. & Bergmann L. (1982) Effect of sulphur deficiency on protein synthesis and amino acid accumulation in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Z. Pflanzenphysiol*, 108: 235-245.

Kleinhofs A. & Behki R. (1977) Prospect for plant genome modification by nonconventional methods.*Annual Review of Genetics*, 11:79-101.

Knudson C. (1946) A new nutrient solution for orchid seed germination*American Orchid Society Bulletin*, 15: 214-17.

Ko S.W., Wong C.K. & Woo S.C. (1983) A simplified method of embryo culture in *Oryza sativa* L. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 24: 97-101.

Koch K.E. (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants.*Annual Review of Plant Physiology & Molecular Biology*, 47: 509-540.

Kodym A., Zapata-Arias F.J. (2001) Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66: 67-71.

Koens K.B., Nicoloso F.T., Van Vliet T.B.,Harteveld M., Boot C.J.M., Van Iren F., Mulder P.,Libbenga K.R. & Kijne J.W. (1995) Kinetics of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid content in an auxin-dependentsuspension culture of *Nicotiana tabacum* cells *Journal of Plant Physiology*.147: 383-390.

Kohli A., Leech M., Vain P., Laurie D.A., Christou P. (1998) Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two-phase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proceeding of National Academy of Science, USA*, 95: 7203–7208.

köse C. (2007) Effects of direct electric current on adventitious root formation of a grapevine rootstock. American Journal of Enology and Viticulture, 58: 120-123.

Kott L.S. & Beversdorf W.D. (1988) Enhanced plant regeneration from microspore derived embryos of *Brassica napus* by chilling, partial desiccation and age selection. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23: 187-192.

Kozai T. & Iwanami Y. (1988) Effects of CO_2 enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L) in tissue culture during the prepration stage. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 57: 279-288.

Kozai T. (1991) Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh, P.C. & Zimmerman, R.M. (Eds.) Micropropagation, Technology and Application. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands. pp 447-469.

Kozai T., Kubota C. & Jeong B.R. (1997) Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro*techniques.*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,51: 49-56.

Kozai T., Oki H. & Fujiwara K. (1987) Effects of CO_2 enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photon fluxes on growth of tissue-

cultured Cymbidium plantlets during the preparation stage. Symp. Florizel on Plant Micropropagation in Hort. Ind. pp 135-141.

Kozai T., Watanabe K. & Jeong B.R. (1995) Stem elongation and growth of *Solanum tuberosum* L. *in vitro* in response to photosynthetic photon flux, photoperiod and difference in photoperiod and dark period temperatures. *Scientia Horticulturea*, 64: 1-9.

Kranz E. & Lorz H. (1993) *In vitro* fertilization with isolated, single gametes results in zygotic embryogenesis and fertile maize plants. *Plant Cell*, 5: 739-746.

Krens F.A., Molendijk L., Wullens G.J. & Schilperoort R.A. (1982) *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature*, 296. 72-74.

Krishna H., Sairam R.K., Singh S.K., Patel V.B., Sharma R.R., Grover M., Nain L. & Sachdev A. (2008) Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Scientia Horticulturea*, 118: 132-138.

Kritzinger E.M., van Vuuren R.J., Woodword B., Rong I.H., Spreeth M.H. & Slabbert M.M. (1997) Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. In: Cassells A.C. (Ed.)International Symposium on Bacterial and Bact. 1997, Kluwer Academic Publisher, The Netherlands. pp 161-168.

Krogstrup P., Find J.I., Gurskov D.J. & Kristensen M.M.H. (2005) Micropropagation of Socotran fig, Dorstenia gigas Scrweinf. Ex. Balf. F.---a threatened species, endemic to the island of Socotra, Yemen.*In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 41: 81–86.

Kromer K. & Kukulczanka K. (1985) *In vitro* cultures of meristem tips of *Canna indica* L. *ActaHorticulturae*, 167: 279-285.

Kumar S., Narula A., Sharma M. P. & Srivastava P.S. (2003) Effect of copper and zinc on growth, secondary metabolite content and micropropagation of *Tinospora cordifolia*: A medicinal plant. *Phytomorphology*, 53: 79-91.

Lall S., Nettleton D., DeCook R., Che P. & Howell S.H. (2004) Quantitative trait loci associated with adventitious shoot formation in tissue culture and the program of shoot development in arabidopsis. Genetics, 167: 1883-1892.

Lambe P., Mutambel H.S.N., Fouche J.G., DeltourR., Foidart J.M. & Gaspar T.H. (1997) DNA methylation asa key process in regulation of organogenic totipotency andplant neoplastic progression. *In vitro Cellular and development Biology-Plant*,33: 155-162.

Langford P.J. & Wainwright H. (1987) Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Annals of Botany*, 60: 633-640.

Langhansova L., Konradova H. & Vanek T. (2004) Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos, *Plant Cell Reports*,22: 725-730.

Lardet L., Aguilar M.E., Michaux-Ferriere N. & Berthouly N. (1998) Effect of strictly plant-related factors on the response of *Hevea brasiliensis* and *Theobroma cacao* nodal explants cultured *in vitro*. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*. 4: 34-40.

Larkin P.J. & Scowroft W.R. (1981) Somaclonal variation---a novel source of variation from cell culture for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60: 197–214.

Larkin P.J., Brettell R.I.S., Ryan S.A., Davies P.A., Palotta W.A., Scowcroft W.R. (1985) Somaclonal variation: impact on plant biology and breeding stratgegies. In: Zaitlin M., Day P., & Hollaender A. (Eds.) Biotechnology in Plant Science, Academic Press, New York, USA. pp 83-100.

Last D.I. & Brettell I.S. (1990) Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Reports*, 9: 14-16.

Laureys F., Dewitte W., Witters E., Van Montagu M., Inzé D. & Van Onckelen H. (1998) Zeatin is indispensable for the G2-M transition in tobacco BY-2 cells. *FEBS Letters*. 426: 29-32.

Lazcano C.A., Davies F.T., Duray S.A. & Estrada-luna A. (1997) Effect of IBA and wounding on adventitious root formation of *Opuntia s pp* Cladodes. Fifth International Congress of Cactus Pear and 7th Mexican Congress of Nopales. Monterrrey, Mexico, September 5-9.

Lazzeri P.A., Hildebrand D.F., Sunega J., Williams E.G. & Collins G.B. (1988) Soybean somatic embryogenesis: interactions between sucrose and auxin.*Plant Cell Reports*, 7: 517-520.

Lee M. & Phillip R.L. (1988) The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39: 413-437.

Lee M. & Phillips R.L. (1987) Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture.*Genome*, 29: 122-128.

LeGuen Le-Sason F., Hourmant F., Esnqul T.& Chauvin J.E. (2002) *In vitro* bulb development in Shalot (*Allium cepa* L.) Aggregatum group.Effect of antigibberelic, sucrose and ligh.*Annals of Botany*, 89: 419-425.

Leifert C. & Cassells A.C. (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures.*In vitro Cellular and Development Biology - Plant* 37: 133–138.

Leifert C., Murphy K.P. & Lumsden P.J. (1995) Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures.*Critcal Reviews Plant Science*, 14: 83-109.

Leljak-Levanic D., Bauer N., Mihaljevic S. & Jelaska S. (2004) Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo* L. *Plant Cell Reports*, 23: 120-127.

Lemos E.E.P. & Blake J. (1996) Micropropagation of juvenile and adult *Annona squamosa*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 46: 77-79.

Leshem B. (1983) Growth of carnation meristems *in vitro*: Anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation. *Annals Botany*, 52: 413-415.

Lian M.L., Murthy H.N. & Paek K.Y. (2002) Effects of light emitting diodes on the *in vitro* induction and growth of bulblets of *Lilium* oriental hybrid 'Pesaro'. *Scientia Horticulturae*, 94: 365–370.

Lindsey K. & Jones M.G.K. (1990) Plant Biotechnology in Agriculture.Prentice- Hall, NJ, USA.

Ling D.X., Luckett D.J. & Darvey N.L. (1991) Low-dose gamma irradiation promotes wheat anther culture response. *Australian Journal of Botany*, 39: 467-474.

Liu T.A., Hsu N-W. & Wu R-Y. (2005) Control of leaf-tip necrosis of micropropagated ornamental statice by elimination of endophytic bacteria. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 41: 546-549.

Llorente D.E. & Apostolo N.M. (1998) Effect of different growth regulators and genotypes on *in vitro* propagation of jojoba.*NZ Journal Crop Horticultural Science*, 26: 55-62.

Logemann J. & Schell J. (1993) The impact of biotechnology on plant breeding, or how to combine increases in agricultural productivity with an improved protection of the environment. In: Chet I. (Ed.), Biotechnology in Plant Diseases. Wiley-Liss, New York, USA. pp 1-14

Loreti F., Morini S. & Concetti S. (1988) Effect of potassium and nitrogen concentration on growth of peach shoots cultured *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 227: 311-317.

Lorz H. & Scowcroft W.R. (1983) Variability among plants and their progeny regenerated from protoplasts of Su/su heterozygotes of *Nicotiana tabacum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 66: 67-75.

Loschiavo F., Pitto L., Guiliano G., Torti G., Nuti-Ronchi V., Marazziti D., Vergara R., Orselli S., Terzi M. (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theoretical and Applied Genetics*, 77: 325–331

Loureiro J., Capelo A., Brito G., Rodriguez E., Silva S., Pinto G. & Santos C. (2007) Micropropagation of Juniperus phoenicea from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 51: 7-14.

Lucchesini M., Mensuali-Sodi A., Massai R. & Gucci R. (2001)Development of autotrophy and tolerance to acclimatization of *Myrtus communis* transplants cultured *in vitro* under different aeration.*Biologia Plantarum*, 44: 167-174.

Lucyszyn N., Quoirin M., Homma M.M. & Sierakowski M.-R. (2007) Agar/galactomannan gels applied to shoot regeneration from tobacco leaves. Biologia Plantarum, 51: 173-176.

Lucyszyn N., Quoirin M., Koehler H.S., Reicher F. & Sierakowski M.R. (2006) Agar/galactomannan blends for strawberry (*Fragaria x ananassa* Duchesne) cv. Pelican micropropagation. *Scientia Horticulturae,* 107: 358-364.

Luo J., Wawrosch C., Kopp B. (2009) Enhanced micropropagation of Dendrobium huoshanense C.Z. Tang et S.J. Cheng through protocorm-like bodies: The effects of cytokinins, carbohydrate sources and cold pretreatment. Scientia Horticulturea, 123: 258-262.

Luo Z. & Wu R. (1988) A simple method for the transformation of rice via the pollen tube pathway.*Plant Molecular Biology Reporter*, 6:165–74.

Lynch J, Polito V.S. & Lauchli A. (1989). Salinity stress increases cytoplasmic Ca^{2+} activity in maize root protoplasts. *Plant Physiology,* 90: 1271-1274.

Machakova I., Zazimalova E. & George E.F. (2008) Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology, 3rd edn.Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 175-205.

Mandal A.K.A., Chakrabarty D. & Datta S.K. (2000) Application of *In vitro* techniques in mutation breeding of chrysanthemum. *Plant Cell, Tissue and Ogan Culture,* 60: 33–38.

Manly J., Slovin J.P. & Cohen J.D. (2004) Auxin biosynthesis and metabolism. In: Davies P.J. (Ed.): Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action. Springer-Verlag, Berlin, Germany- Kluwer Academic Publisher, New York, Dordrecht pp 36-62.

Maraschin S.F., de Priester W., Spaink H.P. & Wand M. (2005) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective.*Journal of Experimental Botany*, 56: 1711-1726.

Marcia O.M., Melo M. & Appezzato-da-Gloria B. (2001) Histological Analysis of the Callogenesis and Organogenesis from Root Segments of *Curcuma zedoaria* Roscoe. *Brazilian Archive of Biology and Technology*, 44: 197-203.

Marıa de los A., Nieves N., S´anchez M., Borroto C.G., Castillo R., Gonz´alez J.L., Escalona M., Baez E. & Hernandez Z. (1997) Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum sp.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51: 153-158.

Martınez L.E., Aguero C.B., Lopez M.E. & Galmarini C.R. (2000) Improvement of *in vitro* gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines. *Plant Science*, 156: 221-226.

McGranahan G.H., Leslie C.A., Uratsu S.L., Martin L.A. & Dandekar A.M. (1988) Agrobacterium-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 6: 800-804.

Mederos-MolinaS. (2008) Micropropagation of Isoplexis chalcantha Svent, O´Shanahan from Mature Plants. Plant Tissue Culture & Biotechnology, 18: 131-137

Mehrotra S., Goel M.K., Kukreja A.K. & Mishra B.N. (2007) Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology*, 6: 1484-1492.

Melchers G. & Labib G. (1974) Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts I. Selection of light resistant hybrids of "haploid" light sensitive varieties of tobacco. *Molecular Genral Genetics*, 135: 277-294.

Melchers G., SaCristan M.D. & Holder A.A. (1978) Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Resarch Communcation*, 43: 203-218.

Mhatrea M., Salunkheb C.K., Rao P.S. (2000) Micropropagation of *Vitis vinifera* L: towards an improved protocol. *Scientia Horticulturae*, 84: 357-363.

Mimura T., Shindo C., Kato M., Yokota E., Sakano K., Ashihara H. & Shimmen T. (2000) Regulation of cytoplasmic pH under extreme acid conditions in suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*: a possible role of inorganic phosphate. *Plant and Cell Physiology*, 41: 424-431.

Mitra A., Dey S. & Sawarkar S.K. (1998) Photoautotrophic *in vitro* multiplication of the orchid *Dendrobium* under CO2 enrichment. *Biologia Plantarum*, 41: 145-148.

Miyawaki K., Matsumoto M. & Kakimoto T. (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyl transferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal*, 37: 128-138.

Mohamed M.A-H (2000) In vitro selection of stress tolerant cell lines and plants of *Tagetes* spp. PhD. Dissertaion, Coventry University, Uk.

Mohamed M.A-H, Alsadon A.A. & Al Mohaidib M.S. (2010a) Corn and potato starch as an agar alternative for *Solanum tuberosum* micropropagation. *African Journal of Biotechnology*,9:12-16.

Mohamed M.A-H, Harris P.J.C. & Henderson J. (1999) An efficient *in vitro* regeneration protocol for *Tagetes minuta*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55: 211-215.

Mohamed M.A-H. & Alsadon A.A. (2011) Effect of vessels type and growth regulators on micropropagation of *Capsicum annuum* L. 'cv. Anaheim'. *Biologia Plantarum*, 55: 370-374.

Mohamed M.A-H. (2011) A protocol for the mass-micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 86: 135-140.

Mohamed M.A-H., Alsadon A.A. (2010b) Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. Scientia Horticulturae,123:295-300.

Mohamed M.A-H., Harris P.J.C. & Henderson J. (2000) *In vitro* selection and characterisation of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*.*Plant Science*, 159: 213-222.

Mohan S.J. (1997) Micropropagation of selected somaclones of Begonia and Saintpaulia.*Journal of Biosciences*, 22: 585–592.

Mondal T.K., Bhattacharya A., Laxmikumaran M. & Ahuja P.S. (2004) Review of Plant Biotechnology and Applied Genetics: Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 195-254.

Monteuuisin O. (2004) *In vitro* Micropropagation and rooting of acacia mangiummicroshoots from Juvenile and mature origins. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 40: 102-107.

Morel G. (1960) Producing virus-free *Cymbidium*.American Orchid Society Bull. 29, 495-497.

Moshkov I.E., Novikova G.V. & Hall M.A. (2008) Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology, 3rd edn.Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 227- 283.

Moyer J.W. & Collins W.W. (1983) 'Scarlet' sweet potato. HortScience, 18: 111-112.

Muhitch M.J., Edwards L.A. & Fletcher J.S. (1983) Influence of diamines and polyamines on the senescence of plant suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 2: 82-84.

Muleo R., Morini S. & Casano S. (2001) Photoregulation of growth and branching of plum shoots: physiological action of two photosystems. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 37: 609-617.

Muller A.J. & Grafe R. (1978) Isolation and characterization of cell lines of *Nicotianatabacum* lacking nitrate reductase.*Molecular General Genetic*, 161: 67-76.

Munetaka S. (1999) Organogenesis *in vitro*.*Current Opinion inPlant Biology*, 2: 61–64.

Munksgaard D., Mattsson O. & Okkele F.T. (1995) Somatic embryo development in carrot is associated with an increase in levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and DNA methylation. *Physiologa Plantarum*, 93:5–10.

Murashige T. & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.*Physiologa Plantarum*, 15: 473-497.

Naik P.S. & Sarkar D. (2001) Sago: an alternative cheap gelling agent for potato *in vitro* culture. *Biologia Plantarum*, 44: 293-296.

Nakano M., Niimi Y., Kobayashi D. & Watanabe A. (1999) Adventitious shoot regeneration and micropropagation of hybrid tuberous begonia (*Begonia x tuberhybrida* Voss). *Scientia Horticulturea*, 79: 245-251.

Nakano M., Sakakibara T., Suzuki S. & Saito H. (2000) Decrease in the regeneration potential of long-term cell suspension cultures of *Lilium formosanum* Wallace and its restoration by the auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Plant Science*, 158: 129-137.

Nandi S.K., Tamta S. & Palni L.M.S. (2002) Adventitious root formation in young shoots of *Cedrus deodara*. *Biologia Plantarum*, 45: 473-476.

Nascimento L.C., Pio-Ribeiro G., Willadino L. & Andrade G.P. (20[illegible]) Stock indexing and potato virus y elimination from potato plants cultivated *in vitro*. *Scientia Agricola*, 60: 525-530.

Neumann K-H., Kumar A. & Imani J. (2009) Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology Basics and Application. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Newell C., Growns D. & McComb J. (2006) Aeration is more important than shoot orientation when rooting lentil (*Lens culinaris* Medik.) cv. `Digger" microcuttings *in vitro*. *In vitro Cellular and development Biology-Plant*, 42: 197-200.

Nguyen Q.T. & Kozai T.(2005) Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: *Kozai* T., Afreen F. & Zobayed S.M.A. (Eds.) Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a New Micropropagation and Transplant Production System. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 123-146.

Nhut D.T., Takamura T., Watanabe H., Okamoto K. & Tanaka M. (2003) Responses of strawberry plantlets cultured *in vitro*under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs).*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73: 43-52.

Nhut D.T., Van Le B., Fukai S., Tanaka M.& Tran K. (2001) Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum*via young stem culture. *Plant Growth Reguation*, 33: 59-65.

Nikbakht A., Kafi M., Mirmasoumi M. & Babalar M. (2005) Micropropagation of Damask rose cvs Ghamsar and Azaran. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7: 535-538.

Nissen S.J. & Sutter E.G. (1988) Stability of IAA and IBA in nutrient medium after autoclaving and after storage under various environmental conditions. *HortSciences*, 23: 758.

Nitsch J.P. & Nitsch C. (1969) Haploid plants from pollen grains.*Science*, 163: 85-87.

Nitsch J.P. (1951) Growth and development *in vitro* of excised ovaries.*American Journal of Botany*, 38: 566-577.

Ochatt S.J. & Power J.B. (1992) Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In: Moo-Young M., Warren G.S. & Fowler M.W. (Eds.), Comprehensive Biotechnology (2nd Suppl.). Pergamon Press, New York, USA. pp 99-127.

Ogura-tsujita Y. & Okubo H. (2006) Effects of low nitrogen medium on endogenous changes in ethylene, auxins, and cytokinins in *in vitro* shoot formation from rhizomes of *cymbidium kanran*. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 42: 614-616.

Ohki S. & Sawaki S. (1999) The effects of inorganic salts and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and leaf chlorophyll content of *Delphinium cardinale*. *Scientia Horticulturea*, 81: 149-158.

Orczyk W. & Malepszy S. (1985) *In vitro* culture of *Cucumis sativus* L.V. Stabilizing effect of glycine on leaf protoplasts. *Plant Cell Reports*, 4: 269-273.

Orlikowska T., Izabela S. A. & Kucharska D. (2000) The effect of leaf and shoot tip removal and explant orientation on axillary shoot proliferation of *Codiaeum variegatum* Blume var. *pictum* Muell. Arg. cv. Excellent.*Scientia Horticulturea*, 85: 103-111.

Owens L.D. & Wozniak C.A. (1991) Measurement and effects of gel matric potential and expressibility on production of morphogenic callus by cultured sugarbeet leaf discs. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 26: 127-133.

Paek K.Y., Chakrabarty D. & Hahn E.J. (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural & medicinal plants.*Plant Cell Tissue Organ Culture*, 81: 287-300.

Palni L. (1984) Cytokinin Accumulation in the Culture Medium of *Vinca rosea* L. Crown-Gall Tissue: a Time-Course Study. *Australian Journal of Plant Physiology*, 11: 129-136.

Pan M.J. & Van Staden J. (1998) The use of charcoal in *in vitro* culture—a review. *Plant Growth Regultion*, 26: 155–63.

Panaia M., Senaratna T., Bunn E., Dixon K.W. & Sivasithamparam K. (2000) Micropropagation of the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (Solanaceae). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 63: 23-29.

Papafotiou M., & Martini A.N. (2009) Effect of position and orientation of leaflet explants with respect to plant growth regulators on micropropagation of *Zamioculcas zamiifolia* Engl. *(ZZ)*. *Scientia Horticulturea*, 120: 115-120.

Parton R.M. Fischer R. Malho O. Papasoulioties, Jelitto T.C., Leonard T. & Read N.D. (1997) Pronounced cytoplasmic pH gradients are not required for tip growth in plant and fungal cells. *Journal of Cell Science*, 110: 1187-1198.

Pasternak T., Miskolczi P., Ayaydin F., Mészáros T., Dudits D. & Fehér A. (2000) Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Growth Regultion*, 32: 129-141.

Pasternak T.P., Prinsen E., Ayaydin F., Miskolczi P., Potters G., Asard H., Van Onckelen H.A., Dudits D. & Feher A. (2002) The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology*, 129: 1807-1819.

Pechan P.M., Bartels D., Brown D.C.W. & Schell J. (1991) Messenger-RNA and protein changes associated with induction of *Brassica* microspore embryogenesis. *Planta*, 184: 161-165.

Pedraza-Santos ME, Lopez-Peralta MC, Gonzalez-Hernandez VA, Engleman-Clark EM, Sanchez-Garcia P (2006) *In vitro* regeneration of Alstroemeria cv. 'Yellow King' by direct organogenesis.*Plant Cell, Tissue and Orgain Culture*, 84: 189–198.

Perez-Parron M.A., Gonzalez-Benito M.E. & Perez C. (1994) Micropropagation of *Fraxinus angustifolia* from mature and juvenile plant material. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37: 297-302.

Perl A., Aviv D. & Galun E. (1988) Ethylene and *in vitro* culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of an alien gene. *Plant Cell Reports*, 7: 403-406.

Peschke V.M. & Phillips R.L. (1991) Activation of the maize transposable element *suppressor-mutator* (*Spm*) in tissue culture.*Theoretical and Applied Genetics*, 81: 90–97.

Peschke V.M., Phillips R.L. & Gengenbach B.G. (1991) Genetic and molecular analysis of tissue culture-derived Ac elements. *Theoretical and Applied Genetics*, 82: 121–129.

Petolino J.F., Cowen N.M., Thompson S.A., Mitchell J.C. (1990) Gamete Selection for Heat-Stress Tolerance in Maize. Journal of Plant Physiology, 136: 219-24.

Phelan S., Douglas G. & Hunter A. (2006) Micropropagation and growth regulation of *tulbaghia violacea* 'silver lace' ISHS Acta Horticulturae 764: XXVII International Horticultural Congress - IHC2006: International Symposium on Plant Biotechnology: From Bench to Commercialization.

Phillips G.C. & Hubstenberger J.F. (1985) Organogenesis in pepper tissue cultures.*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4: 261-269.

Phillips J.L., Haggran W., Thomas J., Jones I.T. & Adey W.L. (1992) Magnetic field-induced changes in specific gene transcription.*Biochimstry Biophysical Acta*, 1132: 140-144.

Phillips R.L., Kaeppler S.M. & Olhoft P. (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 91: 5222- 5226.

Piao X.C., Chakrabarty D., Hahn E.J. & Paek K.Y. (2003) A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system.*Current Science*, 84:1129–1132.

Piatczaka E., Wielanekb E., Wysokinska H. (2005)Liquid culture system for shoot multiplication & secoiridoid production in micropropagated plants of *Centaurium erythraea* Rafn. *Plant Science*, 168: 431–437.

Pierik R.L.M. (1987) *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publisher, The Netherlands.

Pious T., Sinna K. & Gowda T.K.S (2007) Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from *in vitro* cultures and host-endophyte interaction *in vitro* and in vivo. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 380-390.

Podwyszynska M. & Olszewski T. (1995) Influence of Gelling Agents on Shoot Multiplication and the Uptake of Macroelements by *In vitro* Culture of Rose, Cordylineand Homalomena.*Scientia Horticulturae*, 64: 77-84.

Polsoni L., Kott L.S. & Beversdorf W.D. (1988) Large-scale microspore culture technique for mutation-selection studies in *Brassica napus*. *Candian Journal of Botany*, 66: 1681-1685.

Ponappa T., Brzozo Wski A.E. & Finer J.J. (1999) Transient expression and stable transformation of soybean using the jellyfish green fluorescent protein. *Plant Cell Reports*, 19: 6-12.

Pospisilová J., H. Synková D. Haisel & Semorádová (2007) Acclimation of plantlets to ex vitro conditions: Effects of air humidity, irradiance, CO_2 concentration and abscisic acid (a review). *Acta Horticulturae*, 748: 29-38.

Pospisilova J., Ticha I., Kadlecek P., Haisel D. & Plzakova S. (1999) Acelimatization of micropropagated plants to *ex-vitro* condiation. *Biologia Plantarum*, 42: 481-497.

Powell W. & Uhrig H. (1987) Anther culture of *Solanum* genotypes. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 11: 13-24.

Power J.B., Cummins S.E. & Cocking E.C. (1970) Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature*, 225: 1016-1018.

Prakash S. (1993) Production of ginger and turmeric through tissue culture methods and investigations into making tissue culture propagation less expensive. Ph.D. Thesis. Bangalore Univ. Bangalore.

Prakash S., Agrawal V. & Gupta S.C. (2003) Influence of some adjuvants on *in vitro* clonal propagation of male and female *Jojoba* plants. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 39: 217-222.

Prakash S., Hoque M.I., Brinks T (2004) Culture media and containers. In: Low Cost Options for Tissue Culture Technology in Developing Countries, Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, held in Vienna, 26–30 August 2002,IAEA, Vienna, pp 29-40.

Prameswara V.A., Johnston M, Perkins M., Robertson V. & Ratnadewi D. (2009) Ethylene influences development and flowering of *Ptilotus* s pp *in vitro* and *ex vitro*.*Scientia Horticulturae*, 122: 227-232.

Prathanturarug S., Soonthornchareonnon N., Wongsatit C.,Yuwalak P. & Promjit S. (2007) An improved protocol for micropropagation of *Mallotus repandus* (Willd.) Müll. Arg.*In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 43: 275-279.

Predieri S. (2001) Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 185-210.

Preece J. (2008) Stock Plant Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 403-422.

Preece T.F. (1988) The natural history of plant pathogenic bacteria in and on plants. *Acta Horticulturae*, 225: 19–25.

Prknov H (2007) The use of silica sand in micropropagation of woods. *Journal Forest Sciences*, 53: 88-92.

Przetakiewic Z.A., Orczyk W. & Nadolska-Orczyk A. (2003) The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant Cell, Tissue and OrganCulture* 73: 245-256.

Puigderrajols P., Celestino C., Suils M., Toribio M. & Molinas M. (2000) Histology of organogenic and embryogenic responses in cotyledons of somatic embryos of *Quercus suber* L. *International Journal of Plant Sciences*, 161:353-362.

Purohit S.D. & Singhvi A. (1998) Micropropagation of *Achras sapota* through enhanced axillary branching. *Scientia Horticulturea*, 76: 219-229.

Puschmann R., Ke D. & Romani R. (1985) Ethylene production by suspension-cultured pear fruit cells as related to their senescence. *Plant Physiology*, 79: 973-976.

Puthur J.S., Prasad K.V.S.K., Sharmila P. & Pardha Saradhi P. (1998) Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi improves establishment of micropropagated *Leucaena leucocephala* plantlets. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **53**: 41–47.

Quraishi A., Koche V., Sharma P. & Mishra S.K. (2004) *In vitro* Clonal Propagation of Neem (*Azadirachta indica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78: 281-284.

Răcuciu M., Creangă D. & Horga I. (2008) Plant growth under static magnetic field influence. *Roman Journal of Physical*, 53: 353–359.

Rai M.K. (2001) Current advances in mycorrhization in micropropagation.*In vitroCellular and Developmental Biology- Plant* 37: 158–167.

Rains D.W., Valentine R.C. & Hollaender A. (1980) *Genetic Engineering of Osmoregulation*. Plenum Press, New York, London, UK.

Rakoczy-Trojanowska M. (2002) Alternative methods of plant transformation — A short review. *Cellular Molecular Biology Letters*, 7: 849–858.

Rakosy-Tican L., Aurori C.M. & Morariu V.V. (2005) Influence of near null magnetic field on *in vitro* growth of potato and wild *Solanum* species. *Bioelectromagnetics*, 26: 548-557.

Ramage C.M. & Williams R.R. (2002) Mineral nutrition and plant morphogenesis.*In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 38: 116-124.

Ramming D.W. (1990) The use of embryo culture in fruit breeding. *HortSciences*., 25: 393-398.

Rao A.Q., Bakhsh A., Kiani S., Shahzad K., Shahid A.A., Husnain T. & S. Riazuddin (2009) The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances*, 27: 753-76.

Rao N.K. (2004) Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3:136-145.

Rathore J.S., Rathore M.S., Singh M., Singh R.P. & Shekhawat N.S. (2007) Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*. *Indian Journal of Biotechnology*, 6: 239-244.

Rathore J.S., Vinod Rathore N.S., Shekhawat R.P. Singh G. L., Phulwaria M. & Dagla H.R. (2005) Micropropagation of Woody Plants. In: Srivastava P.S., NarulaA. & Srivastava S. (Eds.) Plant Biotechnology and Molecular Markers Anamaya Publishers, New Delhi, India. pp 195-205.

Razdan M.K. (2002) *Introduction to Plant Tissue Culture*.Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, India.

Read P.E. (1988) Stock plants influence micropropagation success. *Acta Horticulturae* 226:41-52.

Redenbaugh K., Nichol J., Kossler M.E. & Paasch B. (1984) Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. *In vitro*, 20: 256-257.

Reed S.M (2005)Haploid Cultures. In: Trigiano R.N. & Gray D.J. (Eds.) Plant Development And Biotechnology. CRC Press, Boca Raton London New York Washington, D.C. pp 225- 234.

Reidiboym-talleux L., Diemer F., Sourdioux M., Chapelain K. & De-march G.G.(1999) Improvement of somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunusavium*), effect of maltose and ABA supplements.*Plant Cell Tissue Organ Culture*, 55: 199-209.

Revilla A.M., Pacheco J., Casares A. & Rodriguez R. (1996a) *In vitro* reinvigoration of mature Olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 32: 257-261.

Revilla M.A., Pacheco J., Casares A., Rodriguez R. (1996b) Induced rejuvenation of mature olive trees cvArbequina.*In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 32: 257-261.

Rey M., Diaz-Sala C. & Rodriguez R. (1994) Polyamines as markers for juvenility in filbert. *Acta Horticulturae* 351: 233-237.

Riek J.D., Piqueras A. & Debergh P.C. (1997) Sucrose uptake and metabolism in a double layer system for micropropagtion of *Rosa multiflora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 269-278.

Robert M.L., Flores M.R. & Loyola-Vargas V.M. (1989) Growth promoting activity of certain penicillins on cultured cells of *Bouvardia ternifolia*. *Phytochemistry*, 28: 2659-2662.

Roberts D.R., Walker M.A., ThompsonJ.E.& DumbroffE.B. (1984) The effects of inhibitors of polyamine and ethylene biosynthesis on senescence, ethylene production and polyamine levels in cut carnation flowers. *Plant and Cell Physiology*, 25: 315-322.

Robinson K.E.P. & Adams D.O. (1987) The role of ethylene in the regeneration of *Helianthus annuus* (sunflower) plants from callus. *Physiologia Plantarum*, 71: 151-156.

Roche T.D. & Cassells A.C. (1996) Gaseous and media-related factors influencing *in vitro* morphogenesis of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) 'Nahodka' node cultures.*Acta Horticulturae*, 440: 588-593.

Rodrigues P.H.V., Tulmann A.N., Cassieri N.P. & Mendes B.M.J. (1998)Influence of the number of subcultures on somaclonal variation in micropropagated Nanico (*Musa* s pp. AAA group).*Acta Horticulturae* 490:469-473.

Roest S. & Bokelmann G.S. (1975) Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram.*in vitro*. *Scientia Horticulturea*, 3: 317-330.

Rout G.R., Mohapatra A. & Jain M.S. (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24: 531–560.

Rout G.R., Samantarayb S. & Das P. (2000) *In vitro* somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Scientia Horticulturea*, 86: 71-79.

Rout G.R., Samoantaray S., MottleyJ. & Das P. (1999) Biotechnology of the rose: a review of recent progress.*Scientia Horticulturae*, 81: 207–28.
Rustaei M., Nazeri S., Ghadimzadeh M. & Hemmati S. (2009) Effect of phloroglucinol, medium type and some component on *in vitro* proliferation of dwarf rootstock of apple (*Mallus domestica*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 11: www.fspublishers.org/ijab/past-issues/IJABVOL_11_NO.../15.pdf
Ružić D., Sarić M., Cerović R. & Ćulafić L. (2000) Relationship between the concentration of macroelements, their uptake and multiplication of cherry rootstock Gisela 5 *in vitro*.*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63: 9-14.
Ruzic R., Jerman I., Jeglic A. & Fefer D. (1993) Various effects of pulsed and static magnetic fields on the developmentof *Castanea sativa* Mill. in tissue culture. *Electro Magnetobiol*, 12: 165-177.
Safarneja A. (2004) Characterization of Somaclones of *Medicago sativa* L. for Drought Tolerance.*Journal of Agricultural Sciences and Technology*, 6: 121-127.
Sahijram L., Soneji J.R, & Bollamma K.T. (2003) Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp).*In vitro Cellular and Development Biology - Plant* 39: 551–556.
Saini R. & Jaiwal P.K. (2002) Age, position in mother seedling, orientation, and polarity of the epicotyl segments of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) determines its morphogenic response. *Plant Science*, 163: 101-109.
Sakakibara H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Physiology*, 57: 431-449.
Salajova T., Salaj J. & Kormutak A. (1999) Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. *Plant Science*, 145: 33-40.
Sallanon H., Laffray D. & Coudret A. (1991) Ultrastructure and functioning of guard cells of *in vitro* cultured rose plants. *Plant physiology & biochemistry*, 29: 333-339.
Salm M.T.P.M., Toorn C.J.G., Hänisch T.C.H., Dubois L.A.M., De Vries D.P. & Donsh J.M. (1994) Importance of the iron chelate formula for micropropagation of Rosa hybrida L. Moneyway. *Plant cell, tissue and organ Culture*, 37: 73-77.
Sanavy A.M. & MoeiniJ.M. (2003) Effects of different pH levels of medium on growth and rooting of single nodes resulted from potato meristem culture. *Plant Tissue Culture*, 13: 151-154.
Santamaria J.M., Murphy K.P., Leifert C. & Lumsden P.J. (2000) Ventilation of culture vessels. II. Increased water movement rather than reduced concentrations of ethylene and CO_2 is responsible for improved growth and development of *Delphinium in vitro*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnolog*. 75: 320-327.
Sarma K.S., Maesato K., Hara T. & Sonoda Y. (1990) Effect of method of agar addition on post-autoclave pH of the tissue culture media. *Annals of Botany*, 65: 37-40.
Saxena C., Samantaray S. Rout G.R. & Das P. (2000) Effect of auxins on *in vitro* rooting of *Plumbago zeylanica*: peroxidase activity as a marker for root induction. *Biologia Plantarum*, 43: 121-124.

Schenk R.U. & Hildebrandt A.C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany,* 50: 199-204.

Schneider F. (2005) Effect of different cultural conditions on micropropagation of rose (*Rosa sp.* L.) and globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). Ph D dissertation, Technische Universitt München.

Scholten H.J. & Pierik R.L.M. (1998) Agar as a gelling agent: different biological effects *in vitro.Scientia Horticulturea*, 77: 109-116.

Scholten H.J. (1998) Effect of polyamines on the growth and development of some horticultural crops in micropropagation.*Scientia Horticulturea*, 77: 83-88.

Schuller A. & Reuther G. (1993) Response of *Abies alba* embryonal-suspensor mass to various carbohydrate treatments. *Plant Cell Repots,* 12: 199-202.

Schwambach J., Fadanelli C. & Fett-Neto A.G. (2005) Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptusglobulus*. *Tree Physiol.*, 25: 487-494.

Scott K.J., Chin J.C. & Wood C.J. (1978) Isolation and culture of cereal protoplasts. In: Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Science Press, Peking, China. pp 293-315.

Seabrook J.E.A. (2005) Light Effects on the Growth & Morphogenesis o f Potato *(Solanum tuberosum) In vitro:* A Review. *Amercan Journal of Potato Resarsh,* 82: 353-367.

Sedlak J., Paprstein F. & Erbenova M. (2008) *In vitro* Propagation of the P-HL Dwarfing Sweet Cherry Rootstocks Proc. 5th on Cherry. *Acta Horticulturae*, 795: 395-399.

Semal J. & Lepoivre P. (1990) Application of tissue culture variability to crop improvement. In: S.S. Bhojwani (Ed.), Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pp 301-315.

Semorádová Š., Synková H. & Pospíšilová J. (2002) Responses of tobacco plantlets to change of irradiance during transfer from in vitro to ex vitro conditions. Photosynthetica, 40:605–614.

Senda M., Takeda J., Abe S. & Nakamura T. (1979) Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation.*Plant Cell Physiology*, 20: 1441-1443.

Serret M.D. & Trillas M.I. (2000) Effects of light and sucrose levels on the anatomy, ultrastructure, and photosynthesis of *Gardenia jasminoides* Ellis leaflets cultured *in vitro.International Journal of Plant Science,* 161: 281-289.

Sessitsch A., Reiter B., Pfeifer U. & Wilhelm E. (2002) Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomycetes*-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbial Ecology, 39*: 23-32.

Shaik S., Dewir Y.H., Singh N., Nicholas A. (2009)Micropropagation and bioreactor studies of the medicinally important plant *Lessertia* (*Sutherlandia*) *frutescens* L. *South African Journal of Botany*, 76: 180-186..

Sharifian S., Vahdati K., Mirmasoumi M. & Ghaem Maghami S.A. (2009) Assessment of Phloroglucinol effect on rooting of tissue cultured *Persian* walnut. *Acta Horticulturae*, 812: 189-196.

Shatnawi M.A., Shibli R.A. & Migdadi (2006) Influence of different carbon sources on wild pear (*Pyrus syriaca*) growth and sugar uptake. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2: 156-161.

Sha-valli Khan P.S., Hausman J.F. & Rao K.R. (1999) Effect of agar, MS medium strength, sucrose and polyamines on *in vitro* rooting of *Syzygium alternifolium*.*Biologia Plantarum*, 42: 333-340.

Shields R., Robinson S.J. & Anslow P.A. (1984) Use of fungicides in plant tissue culture.*Plant Cell Reports*, 3: 33-36

Shoeb F., Yadav J.S., Bajaj S. & Rajam M.V. (2001) Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of *indica* rice. *Plant Science*, 160: 1229-1235.

Singh P., Roy B.K. & Rai S. (1996) Morphological and cytogenetic effect of 50 Hz EM-field-induced nutrient solution on *Vicia faba* L. *Electro-Magnetobiol*, 15: 109-118.

Singh S.K. & Shyamal M.M. (2000) Effect of media and physical factors on *in vitro* rooting in roses.*Horticultural Journal*, 14: 91-97.

Singh S.K., Rai M.K., Asthana P. & Sahoo L. (2009) An improved micropropagation of *Spilanthes acmella* L. through transverse thin cell layer culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31: 693-698.

Skirvin R.M. & Janick J. (1976) Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* s pp. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 101: 281-290.

Skirvin R.M., Chu M.C., Mann M.L., Young H., Sullivan J. & Fermanian T. (1986) Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. *Plant Cell Reports*, 5: 292-294.

Smith M.A., Davies P.J. & Reid J.B. (1985) Role of polyamines in gibberellin-induced internode growth in peas.*Plant Physiology*, 78: 92-99.

Smith M.A.L., Palta J.P. & Mccown B.H. (1986) Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedlings and greenhouse-grown Asian white birch. *Journal of the American Society for Horticultural Scienc*, 111: 437-442.

Soh W.Y., Choi P.S. & Cho D.Y. (1998) Effects of cytokinin on adventitious root formation in callus cultures of *Vigna* unguiculata (L.) walp. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 34: 189-195.

Spiegel-Roy P. & Saad S. (1986) Effect of carbohydrates and inhibitors of GA3 biosynthesis on embryogenic potential of salt tolerant and non-tolerant callus lines or orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Science*, 47: 215-220.

Stafford A. & Warren G. (1991) Plant Cell and Tissue Culture.John Wiley & Sons, New York, USA.

Stange B.C., Rowland R.E., Rapley B.I. & Podd J.V. (2002) ELF magnetic fields increase amino acid uptake into *Vicia faba* L. roots and alter ion movement across the plasma membrane. *Bioelectromagnetics*, 23: 347-354.

Stasolla C., van Zyl L., Egertsdotter U., Craig D., Liu W. & Sederoff R.R. (2003) The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiology*, **131**: 49-60.

Steffens G.L., Wang S.Y., Faust M. & Byun J.K. (1985) Controlling plant growth via the gibberellin biosynthesis system. I. Growth parameter alterations in apple seedlings. *Physiolga Plantarum*, 63: 163-168.

Steinitz B. (1999) Sugar alcohols display nonosmotic roles in regulating morphogenesis and metabolism in plants that do not produce polyols as primary photosynthetic products. *Journal of Plant Physiology*, 155: 1-8.

Stirk W.A., Strnad M., Novak O. & Van Staden J. (2003) Cytokinins in macroalgae.*Plant Growth Regulation*, 41: 13-24.

Suda N., Iwai H., Satoh H., Sakai S. (2009) Benzyladenine arrests cell cycle progression in G1 phase in tobacco BY-2 cells preceding induction of cell death. *Plant Biotechnology*, 26, 225–235.

Suezawa K., Matsuta N. Omura M. & Yamaki S. (1988) Plantlet formation from cell suspensions of kiwi fruit (*Actinidia chinensis* Planch. var. chinensis). *Scientia Horticulturae*, 37: 123-128.

Taber R.P., Zhang C. & Hu W.S. (1998) Kinetics of Douglas- fir (*Pseudotsugamenziesii*) somatic embryo development. *Canadian Journal of Botany*, 76: 863-871.

Tadino V.L.A., Faez J.M., Christiaens L.E., Kevers C., Gaspar T. & Dommes J. (2003) Synthesis and activity of another seleniated auxin: 2,4-dichlorophenylselenoacetic acid. *Plant Growth Regultion*, 40: 197-200.

Takebe I., Labib G. & Melchers G. (1971) Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco.*Naturwissenschaften*, 58: 318-320.

Tang W. & Fan Q.Y. (1999) Plant regeneration *via* organogenesis from six families of loblolly pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58: 223-226.

Tang W. & Newton R.J. (2004) Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science*, 167: 621-628.

Tanimoto S., Miyazaki A. & Harada H. (1985) Regulationby abscisic acid of *in vitro* flower formation in Torenia stemsegments. *Plant Cell Physiology*, 26: 675-682.

Tao W. & Verbelen J. (1996) Switching on and off cell division and cell expansion in cultured mesophyll protoplasts of tobacco.*Plant Science*, 116: 107-115.

Tartoura K., Da Rocha A. & Youssef S. (2004) Synergistic interaction between coumarin 1,2-benzopyrone and indole-3 butyric acid in stimulating adventitious root formation in *Vigna radiata* (L) Wilczek cuttings. I. Endogenous free and conjugated IAA and basic peroxidases. *Plant Growth Regulation*, 42: 253-262.

Teasdale R.D. (1987) Micronutrients. In: Bonga J.M. & Durzan D.E. (Eds.) Cell and Tissue Culture in Forestry Vol 1. General Principles and Biotechnology. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster. pp 17-49

Te-chato S. & Lim M. (2000) Improvement of mangosteen micropropagation through meristematic nodular callus formation from *in vitro*-derived leaf explants. *Scientia Horticulturae*, 86: 291-8.

Terzi M. & Lo Schiavo F. (1990) Developmental mutants in carrot. In: Nijkamp H.I.J., Van Der Plas I.H.W. & Van Aartrijk J. (Eds.) Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Proc. VIIth Int. Cong. on Plant Tissue and Cell Culture.

Tyagi R.K. & Prakash S. (2004) Genotype and sex-specific protocols for *in vitro* micropropagation and medium-term conservation of jojoba. *Biologia Plantarum*, 48: 19-23.

Tyburski J. & Tretyn A. (2004) The role of light and polar auxin transport in root regeneration from hypocotyls of tomato seedling cuttings. *Plant Growth Regulation*, 42: 39-48.

Tynan J.L., Conner A.J., Macknight R.C. & Poulter R.T.M. (1994) Miconazole: An effective antifungal agent for plant tissue culture *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32: 293-301.

Vahdati K., Najafian Ashrafi E., Ebrahimzadeh H. & Mirmasoumi M. (2008) Improved micropropagation of *Walnut* (L.) on media optimized for growth based upon mineral content of walnut seed. ISHS *Acta Horticulturae*, 839.117-124.

Valdés A.E., Belén Fernándeza B & Luz M. (2003) Alterations in endogenous levels of cytokinins following grafting of Pinus radiatasupport ratio of cytokinins as an index of ageing and vigour. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1407-1410.

Valdés A.E., Ordás R.J., Fernández B. & Centeno M.L. (2001) Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea*cotyledons. *Plant Physiol Biochem*, 39: 377–384.

Valero M., Ibañez A. & Morte A. (2003) Effects of high vineyard temperatures on the grapevine leafroll associated virus elimination from *Vitis vinifera* L. cv. Napoleon tissue cultures. *Scientia Horticulturae*, 97: 289-296

Valledor L., Hasbunr., Rodrıguez J.M., Viejo S.F., Berdasco M., Feito I., Fraga M.F., Jesus M., Rodrıguez R. (2007) Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91: 75–86.

Van der Krieken W.M., Breteler H. & Visser M.H.M. (1992) Uptake and metabolism of indolebutyric acid during root formation on Malus microcuttings. *Acta Bot. Neerl.*, 41: 435-442.

Van Huylenbroeck J.M., Huygens H. & Debergh P.C. (1995) Photoinhibition during acclimatization of micropropagated Spathiphyllum "Petite" plantlets. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 31: 160-164,

Van Huylenbroeck J.M., Piqueras A. & Debergh P.C. (1998) Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants.*Plant Science*, 134: 21-30.

Van Huylenbroeck J.M., Piqueras A.& Debergh P.C.(2000)The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated Calathea plants. *Plant Science*, 155: 59-66.

Van staden J. & Drewes F.E. (1992) The stability andmetabolism of benzyladenine glucosides in soybean callus. *Journal of Plant Physiology*, 140: 92-95.

Van Staden J., Zazimalova E. & George E.F. (2008) Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 205-226.

Vasil I.K. (2008) A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, 27: 1423–1440.

Veilleux R.E. & Johnson A.T. (1998) Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization. *Plant Breeding Review*, 16: 229–268.

Veilleux R.E., Compton M.E. & Saunders J.A.(2005) Use of Protoplasts for Plant Improvement. In: Trigiano R.N. & Gray D.J. (Eds.) Plant Development and Biotechnology. CRC Press, Boca Raton London New York Washington, D.C. USA. pp. 213-224.

Vengadesan G., Ganapath A., Amuth S. & Selvaraj N. (2003) High-frequency plant regeneration from cotyledon callus of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr.*In vitro Cellular and development Biology-Plant*, 39: 28-33.

Vengadesan G., Ganapathi A., Anand R.P. & Anbazhagan V.R. (2000) *In vitro* organogenesis and plant formation in *Acacia sinuata. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61: 23-28.

Vengadesan G., Ganapathi A., Anand R.P. & Anbazhagan V.R. (2000) *In vitro* organogenesis and plant formation in *Acacia sinuata. Plant Cell Tissue Organ Culture*, 61: 23-28.

Von Arnold S. (1987) Effect of sucrose on starch accumulation in, and adventitous bud formation on, embryos of *Piceaabies. Annals of Botany*, 59: 15-22.

Von Arnold S. (2008) Somatic Embryogenesis In: George E.F., Hall M.A. & De Klerk G-J. (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture Part I: The Technology, 3rd edn. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 335-254.

Voylatzi C. & Voyiatis D.G. (1988) Shoot proliferation of the rose cv. (H.T.) Dr. Verhage as influenced by apical dominance regulating substances.*Acta Horticulturae*, 226: 671-674.

Wakasa K. (1979) Variation in the plants differentiated from the tissue culture of pineapple. *Japanese journal of breeding*, 29: 13-22.

Walden R. & Wingender R. (1995) Gene-transfer and plant-regeneration techniques.*Trends Biotechnology*, 13: 324-331.

Wan Y., Sorensen E.L. & Liang G.H. (1988) Genetic control of *in vitro* regeneration in alfalfa (*Medicago sativa* L.).*Euphytica*, 39: 3-9.

Wang S. & Steffens G. L. (1987) Effect of paclobutrazol on water stress induced abscisic acid in apple seedlings leaves. *Plant Physiology,* 84: 1051–1054.

Wardle K., Dobbs E.B. & Short K.C. (1983) *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *American Society for Horticultural Science,* 108: 386-38.

Warzecha H.& Hennig A. (2010) Plastid Transformation In: In: Genetic modification of plants - agriculture, horticulture & forestry. Kempken F. & Jung C. (Eds). 64: 23-37.

Watt P.M., Berjak P., Makhathini A. & Blakeway F. (2003) *In vitro*field collection techniques for Eucalyptus micropropagation.*Plant Cell, Tissue and Organ Culture,*75: 233-240.

Weide R., Koornneef M., & Zabel P. (1989) A simple, nondestructive spraying assay for the detection of an active kanamycin resistance gene in transgenic tomato plants. *Theortical Applied Genetetics*, 78: 169-172

Welander M. & Negash L. (2005) Micropropagation of *Hagenia abyssinica*: a multipurpose tree *Tileye Feyissa. Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 80: 119-127.

Wenzel G., Hoffmann F., Potrykus I. & Thomas E. (1975) The separation of viable rye microspores from mixed populations and their development in culture. *Molecular General Genetic*, 138: 293-297.

West T.P. & Preece J. (2006) Use of acephate, benomyl and alginate encapsulation for eliminating culture mites and fungal contamination from *in vitro* cultures of hardy Hibiscus (*Hibiscus moscheutos* L.)*In vitro Cellular and Development Biology - Plant,* 42: 301-304.

Wetzstein H.Y. & Sommer H.E. (1982) Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization.*American Journal of Botany,* 69: 1579-1586.

Williams E. & De Lautour G. (1980) The use of embryo culture with transplanted nurse endosperm for the production of interspecific hybrids in pasture legumes. *Botanical Gazette*, 141: 252-257.

Williams R.R. (1993) Mineral nutrition *in vitro* – A mechanistic approach.*Aust. J. Bot.* 41: 237-251.

Willyams D., Whiteman P., Cameron J. & Chandler S. F. (1992) Inter- and intra-family variation in rooting capacity in micropropagated *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus nitens*. In: Mass Production Technology for Genetically Improved Fast Growing Forest Tree Species (AFOCEL-IUFRO Symposium). II: 177-181. Association Forêt Cellulose, Nangis, France.

Wilson D.P.M., Sullivan J.A., Marsolais A.A, Tsujita M.J. & Senaratna T. (1996) Improvement of somatic embryogenesis in zonal geranium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 47: 27-32.

Withers L.A. (1986) Plant Tissue Culture and its Agricultural Application. Butterworths, London, UK.

Witte C.P., Tiller S.A., Taylor M.A. & Davies H.V. (2002) Addition of nickel to Murashige and Skoog medium inplant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 68: 103-104.

Wojtania A., Puławska J. & Gabryszewska E. (2005) Identification and elimination of bacterial contaminants from *Pelargonium* tissue cultures. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research,* 13: 101-108. .

Woodward A.J., Bennett I.J. & Pusswonge S. (2006) The effect of nitrogen source and concentration, medium pH and buffering on *in vitro* shoot growth and rooting in *Eucalyptus marginata.Scientia Horticulturae,* 110: 208-213

Woodward A.W. & Bartel B. (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annlas of Botany,* 95: 707-735.

Woodward A.W. (2005) A Receptor for Auxin.*The Plant Cell,* 17: 2425-2429.

Wright N.A. (1980) The growth of tulip tissues *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 109: 263-270.

Wu L., Nandi S., Chen L., Rodriguez R.L. & Huang N. (2002)Expression and inheritance of nine transgenes in rice.*Transgenic Research*, 11: 533–541.

Wu X., Zhang F.G., Liu C. & Zhang X. (2009) Differential gene expression of cotton cultivar CCRI24 during somatic embryogenesis.*Journal of Plant Physiology*, 166: 1275-1283.

Yang S-H.& Yeh D-M. (2008)*In vitro* leaf anatomy, ex vitro photosynthetic behaviors and growth of *Calathea orbifolia* (Linden) Kennedy plants obtained from semi-solid medium and temporary immersion systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93: 201–207.

Yano-Melo A.M., Saggin O.J., Lima-Filho J.M., Melo N.F. & Maia L.C. (1999) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. *Mycorrhiza*, 9: 119-123.

Yoon Y.J., Mobin M., Hahn E.J. & Pae K.Y. (2009) Impact of *in vitro* CO_2 enrichment and sugar deprivation on acclamatory responses of *Phalaenopsis* plantlets to *ex vitro* conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 65: 183-188.

Yu T.-A., Yeh S.-D. & Yang, J.-S. (2003) Comparison of effects of kanamycin and geneticin on regeneration of papaya from root tissue.*Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,74: 169–178.

Zambre M., Goossens A., Cardona C., Van Montagu M., Terryn N. & Angenon G (2005) An efficient and reproducible *Agrobacterium* mediated transformation systems for cultivated *Phaseolus acutifolius* (tepary bean*). Theoretical and Applied Genetics*, 110: 914-924.

Zamski E. & Wyse R.E. (1985) Stereospecificity of glucose carrier in sugar beet suspension cells.*Plant Physiology*, 78: 291-295.

Zawadzka M. & Orlikowska T.K. (2006) The influence of FeEDDHA on red raspberry cultures during shoot multiplication and adventitious regeneration from explants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 85: 145-149.

Zeng L., Xu H., Zeng Y., Luan A. & Wang H. (2009) High efficiency *in vitro* plant regeneration from epicotyl explants of Ponkan Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco*). In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 45: 559-564.

Zenkteler M. (1970) Test-tube fertilization of ovules in *Melandrium album* Mill.With pollen grains of *Datura stramonium* L. *Experientia*, 26: 661-662.

Zhang C.L., Chen D.F., Elliott M.C. & Slater A. (2004) Efficient procedures for callus induction and adventitious shoot organogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 40: 475-481.

Zhang J-E., Guo W-W. & Deng X.X. (2006) Relationship between ploidy variation of citrus calli and competence for somatic embryogenesis.*Acta Genetica Sinica.*, 33: 647-654.

Ziv M (1999) Bioreactor Technology for Plant Micropropagation.*Horticultural Reviews*, 24: 1-30.

Ziv M. (1991) Quality of micropropagated plants - vitrification. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 27: 64-69.

Zobayed S. (2005)Ventilation in micropropagation In: T. Kozai, F. Afreen & Zobayed S.M.A. (Eds.) Photoautotrophic (sugar-free medium) Micropropagation as a new micropropagation and transplant production system, Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 147-186.

Zobayed S.M.A., Afreen F. & Kozai T. (2001) Physiology of *Eucalyptus* plantlets cultured photoautotrophically under forced ventilation. *In vitro Cellular and Development Biology - Plant*, 37: 807-813.

Zupan J., Muth T.R., Draper O. & Zambryski P. (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: A feast of fundamental insights. *Plant Journal*, 23: 11–28.

معجم المصطلحات

Abscisic acid (ABA)

حامض الأبسيسيك: هرمون نباتى له دوراً فى الشيخوخة والسكون والإجهاد البيئى.

Agar

الاجار: منتج يصنع من الطحالب البحرية وهو خامل كيميائيا يستخدم لإعطاء البيئة قوام شبة صلب.

Antibiotic

المضاد الحيوى: هو مانع لنمو الكائنات الدقيقة

Adventitious

العرضى: يطلق على العضو النباتى كالقمم الميرستيمية، الجذور، السيقان أنها عرضية إذا تكونت فى مكان غير مكانها الطبيعى مثل تكوين البراعم على الأوراق أو الكالس. أو تكوين الجنين فى أى مكان غير الزيجوت.

Amphidiploid

الفرد شبية الثنائى: النوع المتكون من مضاعفة العدد الكروموسومى للجيل الأول الناتج من تهجين نوعين نباتين مختلفين.

Androgenesis

تكشف النباتات من الجاميطات المذكرة.

Aneuploidy

التضاعف عددى غير تام للكروموسومات: تحدث هذهالحالة عندما لا تحتوى النواة على عدد من الكرموسومات بالمضاعفة التامة للعد الفردى، حيث يوجد زوج أو أكثر من الكرموسومات بعدد أكبر أو أقل من الكرموسومات الأخرى.

Anther culture

مزارع المتك: فصل وزراعة المتك (الجزء الطرفى من عضو التذكير فى الزهرة والذى يحتوى على كيس حبوب اللقاح) للحصول على نباتات أحادية.

Aseptic

مُعقم: خلوالبيئة أو المُستأصَل النباتى من الكائنات الدقيقة، والبكتريا، والفطر، والخميرة، والفيروس، والميكوبلازما.

Apical dominance

ظاهرة السيادة القمية: وهى تثبيط نمو البراعم الجانبية بسبب وجود البرعم الطرفى.

Apical meristem

الميرستيم الطرفي: الميرستيم الموجود على قمة الساق الرئيسى أو الأفرع الجانبية.

Asexual propagation

التكاثر اللاجنسى: إكثار النبات باستخدام أى جزء غير الجنين الناتج من التلقيح والإخصاب.

Autotrophic

ذاتى التغذيـة: إذا كـان النبـات أو الجـزء المنـزرع منـه لا يحتـاج إلـى إضـافة مـادة محـددة لازمة للنمو إلى بيئة النمو حيث يمكن للنبات أو العضو المنزرع تخليق هذا المركب من المواد غير العضوية.

Auxin

الأوكسين: هرمون نبـاتى يعتبـر مشـجع لاستطالة الخلايـا وتكوين الجذور وغيرهـا من العمليات الحيوية، منه ما هو طبيعى IAA ومنه ما هو مصنع مثل 2,4-D.

Auxotroph

غير ذاتى التغذية: إذا كان النبات أو الجزء المنزرع منـه يحتاج إلـى إضافة مـادة محددة لازمة للنمو إلى بيئة النمو حيث لا يمكن للكائن أو العضو تخليق هذا المركب من المواد غير العضوية.

Axillary buds

البراعم الجانبية: هى تلك البراعم المتكونة فى الزاوية المحصورة بين الساق والورقة.

Axenic culture

المزرعـة المعقمـة: المزرعـة التـى لا تحتـوى علـى أي صـورة مـن صـور الحيـاة غيـر المرغوبة، بمعنى خالية من التلوث. لكن فى بعض الحالات يتم عمداً تحضين الأنسجة النباتية مع بعض الكائنات الدقيقة لأغراض مختلفة كالتحول الوراثي.

Bioreactor

المفاعل الحيوى: وهو وعـاء يستعمل فـى العمليات البيولوجيـة لتنميـة الكائنـات الدقيقـة، والخلايـا النباتيـة، والأشـطاء أو الأجنـة الجسـدية بغـض الإكثـار أو الحصـولعلى بغـرض المركبات الفعالة.

Biosynthesis

التخليق الحيوى: استغلال الخلايا الحية أو الكائنات الدقيقة فى تخليق بعض المركبات الكيميائية.

Biotechnology

التقنية الحيوية: استخدام بعض التقنيات لتحوير العمليات الأساسية فى النمو أوالتوالد للنبات أو الحيوان، أو الكائنات الدقيقة بهدف تشجيع إنتاج بعض المركبات أو إنتاج مركبات جديدة.

Callus (Plural: calluses/ calli)

الكالس: يطلق لفظ الكالس على كتلة من الخلايا نشطة الانقسام غير متميزة النمو تتكون عند جرح النسيج النباتى أو فى زراعة الأنسجة.

Cell culture

زراعة الخلايا: زراعة الخلايا الفردية أو مجموعات صغيرة من الخلايا المتشابه.

Chimera

الكيميرا: عبارة عن نبات أو نسيج يحتوى على مجموعتين أو طبقتين من الخلايا مختلفتين وراثيا.

Chromosome

الكروموسوم: جسم خيطى الشكل غالبا ويتكون من المادة الوراثية DNA والبروتينات الهستونية وغير الهستونية

Clone

المستعمرة: مجموعة من الخلايا أو الأنسجة التى تكونت بانقسام خلية واحدة، تطلق أيضا على النباتات التى تكونت من بنات واحد بالإكثار الخضري.

Contaminants

التلوث: فى هذا النسق يشير إلى نمو الكائنات الحية الدقيقة التي ربما تثبط نمو الخلايا أو الأنسجة النباتية.

Cybrid (Cytoplasmic hybrid)

الهجين الجسدى أو السيتوبلازمى: هو الهجين الذى يتم فيه استبعاد نواة أحد الأبوين أما السيتوبلازم فهو من الأبوين أو من أحد الأباء.

Cytokinin

السيتوكينينات: هى هرمونات نباتية عبارة عن مشتقات الأدينين مثل Zeatin وBA أم مشتقات اليوريا مثل TDZ وهى تشجع الانقسام الخلوى، والتكشف، ولها دور في كسر السيادة القمية.

Cytoplasmic hybrid

الهجين السيتوبلازمى: أنظر Cybrid

Deionized water

الماء المتأين: هو الماء الخالى من المركبات غير العضوية.

Detergent

المواد المطهرة: المواد المُطهرة التى تعمل على خفض التوتر السطحى للمحلول وتضاف أثناء التعقيم السطحى للأجزاء النباتية لتزيد من التصاق المحلول المعقم بالسطح النباتى.

Dedifferentiation

الإرتداد إلى عدم التكشف: ارتداد العضو المتميز إلي حالة عدم التميز

Differentiated cell

الخلايا المتكشفة: تكون الخلايا متكشفة لو أظهرت صفات مختلفة عن الخلايا الميرستيمية بمعنى أن تصبح الخلية ذات صفات مورفولوجية أو تشريحية محددة. وحالة التكشف غالبا ثابتة. لكن يستخدم هذا المصطلح فى زراعة الأنسجة ليعنى تكون ساق أو جذر أو جنين من خلايا أو كالس.

Differentiation

التكشف: تحول الخلية الميرستيمية إلى خلية متخصصة فسيولوجياً أو تشريحياً.

Deionize

إزالة الأيونات الموجودة بالماء

Disease-free

نبات خالى من الأمراض: شهادة للنبات من خلال بعض الاختبارات أنه خالى من أمراض محددة.

Diploid

ثنائى نُسخ الأليلات : وجود نسختين من كل كرموسوم مميز للنوع.

Disinfection

التطهير من الجراثيم: قتل الكائنات الدقيقة، ويستخدم كمرادف لتعقيم الأجزاء النباتية.

Distilled water

الماء المقطر: هو الماء الخالى من مركبات عضوية أو غير عضوية.

Electroporation

التثقيب الكهربائى: يتم باستخدام فرق الجهد الكهربائى لتكوبن ثقوب مؤقتة فى الغشاء الخلوي تسمح بدخول بعض المواد كالحامض النووي أو الجينات إلى السيتوبلازم

Embryo culture

زراعة الأجنة: زراعة الجنين الناضج أو غير الناضج فى بيئة مغذية.

Embryoid (somatic embryo)

الجنين الجسدي: نشؤ الجنين اللازيجوتي في مزارع الأنسجة من خلايا جسدية.

Embryogenesis

تكوين الجنين: عملية تكوين الجنين سواء من اتحاد خلايا جنسية أو من خلايا جسدية.

Endomitosis

التضاعف الميتوزى: تضاعف العدد الكروموسومى بسبب انقسام النواة دون انقسام السيتوبلازم.

Endopolyploidy

التضاعف الداخلى: إنتاج أفراد متضاعفة بسبب حدوث تضاعف العدد الكرموسومى للخلية دون انقسامها.

Epigenetic variations

التغيرات غير المورثة: تلك التغيرات غير المورثة التى لا تعكس تغيير فى الحامض النووى والتى تنعكس بعد فترة وترتد إلى حالتها الأصلية غالباً، وربما ترجع لتغيير في تعبير الجين.

Endosperm

الإندوسبرم: الطبقة المغذية أو السائل المحيط بالجنين فى البذرة.

Explant

المُستأصَل النباتي: هو ذلك الجزء من النبات الذى يتم فصله وزراعته لبدء تكوين المزرعة فى زراعة الأنسجة.

Feeder layer (Nurse culture)

الطبقة المغذية (الخلايا الحاضنة): طبقة من الخلايا الغير نشطة أما بمعاملتها بالأشعة أو ببعض الكيماويات، تستخدم لتغذية خلايا أخري. وتكون تلك الخلايا الحاضنة ملامسة للبيئة وتوضع فوقها الخلايا أو الأنسجة الأخري مباشرة أو فوق حاجز عبارة عن ورقة ترشيح.

Filter sterilization

التعقيم بالمرشحات: عملية تعقيم المحاليل عن طريق ترشيحها بمرشحات بها ثقوب دقيقة تمنع مرور الكائنات الدقيقة.

Gametoclone

المستعمرات النباتية المستولدة من الجاميطات

Gametoclonal variation

التباين الجاميطي: التباين فى الطرز المظهري للنباتات المستولدة من الجاميطات سواء كان هذاالتباين مورث أو غير مورث.

Genetic engineering

الهندسة الوراثية: تقنية معملية تسمح تحوير الكائن وراثياً بإدخال جين أو أكثر إلى نواة الخلية لإكسابها صفة أو صفات جديدة تورث للنسل.

Genotype

الطرز الوراثي: التركيب الوراثي للفرد والناتج من الكروموسومات التى توجد بنواة الخلية.

Gibberellins

الجبريلينات: وهى مجموعة من منظمات النمو تشجع نمو وانقسام الخلايا وهناك العديد منها.

Growth regulators

منظمات النمو : مواد عضوية غير مغذية توثر وبكميات منخفضة للغاية فى النمو التكشف والتضاعف. وتضم عدة أقسام منها الأكسينات، السيتوكينينات، الإثيلين .... الخ.

Habituation

ظاهرة قد تحدث بعد فترة من زراعة الخلايا حيث بقدرتها على النمو دون الحاجة لإضافة منظمات نمو خارجية.

Harding off

التقسية: عملية الأقلمة التدريجية للنباتات الناتجة من زراعة الأنسجة للظروف الطبيعية.

Haploid

الفرد الأحادى: وجود نسخة واحدة من كروموسوم مميز للنوع فى الخلية.

Heterotrophic

غير ذاتى التغذية: احتياج الكائن إلى إضافة سكر خارجى باستعمال مواد عضوية.

Heterokaryon

تعدد الانوية الخليط: ظاهرة احتواء الخلية على أكثر من نواة مختلفة الأب نتيجة دمج البروتوبلاست.

Homokaryon

تعدد الانوية الذاتى: ظاهرة احتواء الخلية على أكثر من نواة لنفس الأب نتيجة دمج البروتوبلاست.

Hormone

الهرمون: مركب عضوى يخلق فى جزء محدد من النبات وبتركيزات منخفضة للغاية يشجع أو يثبط النمو غالباً فى مكان غير مكان تخليقه. (أنظر Growth regulaors)

Hybridization

التهجين: أى طريقة يتكون عنها فرد هجين (فرد ناتج من أبوين غير متشابهين وراثياً)

Hyperhydration (Vitrification)

التميؤ الزجاجى: عبارة عن ظاهرة غير مرغوبة فى زراعة الأنسجة النباتية قد حيث تأخذ الأنسجة مظهراً عصارياً زجاجياً شفافاً بعض الشىء وتكون هشة سهلة الكسر وتفقد القدرة على النمو الطبيعى

Inoculation

التلقيح: وضع الجزء النباتى أو الخلايا فى أو على بيئة الزراعة فى مزارع الأنسجة.

Intergeneric

الهجين بين الأجناس: الهجين متكون من جنسين مختلفين

Interspecific

الهجين بين الأنواع: هجين متكون من نوعين مختلفين.

Isoenzymes

مشابهات الإنزيم: صور جزيئية مختلفة من الإنزيم لكن لها نفس فعل الإنزيم.

Juvenile phase

مرحلة الشباب: هى الفترة من عمر النبات التى لا يمكن فيها تكوين أزهار وفى هذه الفترة يكون للنبات صفات ظاهرية أو فسيولوجية محددة ومختلفة عن النبات البالغ. ولا يستجيب النبات في تلك المرحلة إلى محفزات الإزهار.

Laminar air flow

كابينة تدفق الهواء: تستخدم فى المعامل لإجراء العمل تحت ظروف هواء معقم مثل زراعة الأنسجة. ويتدفق الهواء بمروره خلال مرشحات دقيقة .

Meristem

الميرستيم: عبارة عن مجموعة من الخلايا الصغيرة نشيطة الانقسام ينتج عنها فى مرحلة لاحقة تكوين عضو محدد. وفى النبات الكامل توجد المناطق الميرستيمية العالية التخصص غالبا فى قمم السوق والجذور.

Meristem culture

زراعة القمم الميرستيمية: هى زراعة القمة الميرستيمة المفصولة من قمة الساق وتشبة القبة وطولها لا يزيد عن ٠.١ مم

Meristemoid

عقدة من الخلايا غير الميرستيمة غير المتكشفة تتكون فى مزارع الكالس ويتكون منها عضو عرضى.

Mesophyll cells

خلايا الميزوفيل: عبارة عن خلايا خضراء ذات قدرة على البناء الضوئى توجد بين طبقتى البشرة العليا والسفلى فى الورقة. هذه الخلايا غير متكشفة نسبيا وغالبا يكون لها القدرة على الارتداد إلى الحالة الميرستيمية والانقسام.

Micrografting

التطعيم الدقيق: تركيب قمة نامية على ساق حديث النمو فى القوارير.

Microinjection

الحقن الدقيق: إدخال جزء من الحامض النووى أو الجين إلى الخلية باستعمال أنبوبة زجاجية دقيقة للغاية (أقل من ميكروميتر).

Minimum inoculation density

أقل كثافة للخلايا المنزرعة: كثافة الخلايا التى إذا قلت عنها لن تتمكن الخلايا من النمو والانقسام فى البيئة الجديدة.

Morphogenesis

التميز: سلسلة من العمليات الفسيولوجية والتشريحية فى الكائن منوط بها نمو وتطور العضو النباتى أو تكوين عضو جديد.

Mutation

الطفرة: حدوث تغير مفاجئ يورث فى الطرز الوراثى بسبب تغيير ثابت فى المادة الوراثية.

Organ culture

زراعة الأعضاء: بحيث يحافظ على نموه وتطوره الطبيعى زمنها مزارع الجذور و مزارع قمم السيقان ومزارع الأجنة.

Organogenesis

التعضون: تكوين عضو من الكالس أو الخلايا المنزرعة.

Osmotic potential

الجهد الأسموزى: هو الضغط الناتج من ذوبان مادة فى المذيب مثلا إذابة ١ مول من الجلوكوز فى لتر من الماء يؤدى إلى ضغط اسموزى مقداره ٢٢.٤ ضغط جوى.

pH

الرقم الهيدروجينى: هو اللوغاريتم السالب لتركيز أيونات الهيدروجين فى الوسط.

Photoperiod

الفترة الضوئية: عدد ساعات الإضاءة التى يتعرض لها النبات أو المزرعة بالتبادل مع عدد ساعات الإظلام.

Phytohormone

الهرمون النباتى: هو مجموعة منظمات النمو الطبيعية فى النبات.

Plating efficiency

كفاءة الزراعة: نسبة عدد الخلايا أو البروتوبلاست الذى تمكن من الانقسام وتكوين كالس عقب الزراعة.

Ploidy

التضاعف: تضاعف عدد الكروموسومات المميز للخلية. ويرمز للخلايا الأحادية بـ n والثنائية 2n والرباعية 4n وهكذا.

Polysaccharide

عديدة التسكر: مجموعة من الكربوهيدرات تتكون من عديد من الوحدات المختلفة من السكر.

Population density

كثافة العشيرة: عدد الخلايا بوحدة المساحة أو الحجم لوعاء الزراعة. أو عدد الخلايا بوحدة الحجم من بيئة الزراعة فى المعلق الخلوى.

Proliferation

تكاثر: التضاعف السريع للوحدات الجديدة (خلايا، أو أعضاء، أو الأجنة)

Protocorn

البرتوكورم: تحتوى بذور الأوركيد على جنين غير كامل التكوين يتألف من عدة مئات من الخلايا. وعند الإنبات أو عند زراعة الأنسجة الخضرية يلاحظ تكوين تركيب شبيه بالدرنات يتكون منه النبات الكامل.

Protoplast

البروتوبلاست: هو الخلية منزوعة الجدار الخلوى.

Protoplast fusion

دمج البروتوبلاست: تقنية دمج البروتوبلاست المتشابه أو المختلف مع بعضة لتكوين هجين جسدى.

Rejuvenation

إعادة الصبا: الارتداد من الحالة البالغة إلى حالة الصبا.

Regeneration

الإستيلاد: وهو تطور الكالس أو الخلايا أو البروتوبلاست المنزرع إلى نبات كامل أو عضو أو جنين.

Shoot tip

قمة الساق: الجزء الطرفي من الساق بطول ٠.٥-٢.٠ مم تقريبا والمحتوى على القمة الميرستيمية وبعض الأوراق وجزء من الساق.

Single-node culture

زراعة العقد الساقية: زراعة جزء من الساق يحتوى على برعم واحد.

Somaclonal variation

التباين الوراثي الجسدي: التباين الوراثي في النباتات أو الخلايا الناتجة من زراعة الأنسجة.

Somatic embryo

الجنين الجسدي: هو تركيب يشبه الجنين الجنسي لكنه ينشأ من خلايا جسدية.

Somatic hybrid

الهجين الجسدي: هجين ينشأ من دمج خلايا غير جنسية.

Subculture

إعادة الاستزراع: نقل الخلايا أو النسيج أو العضو أو النبات من بيئة إلى أخرى.

Synthetic seeds

البذور المصنعة: تغليف الجنين الجسدي أو العقد الساقية أو القمم النامية بغلاف يحميها من الضرر أثناء التداول والزراعة حتى تنبت بطريقة تشبه البذرة العادية

Totipotent cell

القدرة على التكشف: يطلق هذا المصطلح على الخلايا النباتية دون الحيوانية حيث للخلية القدرة الوراثية على أن تتحول إلى نبات كامل.

Undifferentiated tissue

النسيج غير المتكشف: هو الخلايا التي لا تظهر صفات تخصصية محددة كأن تكون أوعية خشب أو لحاء أو جذور مثلا. لكن يجب استعمال هذا المصطلح بحذر حيث أن بعض الخلايا التي تبدو وكأنها غير متخصصة تقوم بتخليق مركب معين.

Vitrification

التميؤ الزجاجي: عبارة عن ظاهرة غير مرغوبة في زراعة الأنسجة النباتية قد حيث تأخذ الأنسجة مظهرا عصاريا زجاجيا شفافا بعض الشيء وتكون هشة سهلة الكسر وتفقد القدرة على النمو الطبيعي.